



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE KOMPLEXNÍCH
LIPOSOMÁLNÍCH SYSTÉMŮ PRO DISTRIBUCI LÉČIV**

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF COMPLEX LIPOSOMAL FOR DRUG DELIVERY SYSTEMS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Jana Szabová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1281/2018
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Jana Szabová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Filip Mravec, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název diplomové práce:

Příprava a charakterizace komplexních liposomálních systémů pro distribuci léčiv

Zadání diplomové práce:

- 1) Provést rešerši na složení a přípravu vezikulárních systémů vhodných pro interakce s polymerem trimethylchitosanem. Zároveň brát v úvahu vhodnost takovýchto systémů pro inhalační podání.
- 2) Na základě literární rešerše vybrat vhodný lipid nebo směs lipidů pro testování s trimethylchitosanem. Vybrat vhodné metody na potvrzení vytvoření takového komplexu.
- 3) Připravit a charakterizovat liposomální komplex lipidů a ověřit jeho interakci s dostupným trimethylchitosanem.
- 4) Na základě experimentů a rešerše zhodnotit potencionální využitelnost takového systému jako prostředku distribuce aktivních látek z hlediska inhalačního podání.

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Jana Szabová
student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá přípravou a charakterizací stealth liposomů a jejich kombinací s trimethylchitosanem (TMC). Tento komplex by mohl najít uplatnění v oblasti inhalačního podávání. Stealth liposomy byly připraveny z neutrálního fosfatidylcholinu, záporně nabitě kyseliny fosfatidové a polyethylenglykolu navázaného na fosfatidylethanolaminu. Podařilo se nám připravit stealth liposomy s vhodnými vlastnostmi, které by měly zaručit pasivní cílení bez vyvolání imunitní reakce, a to i přes obsah záporné komponenty. Dále jsme zjistili vhodnou metodu přípravy pro komplex stealth liposom–TMC, kdy změna velikosti a zeta potenciálu nám potvrdila nekovalentní vazbu mezi dvěma komponenty i přes obsah polyethylenglykolu.

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the preparation and characterization of stealth liposomes and their combination with trimethylchitosan (TMC). This complex could find application in the field of inhalation administration. Stealth liposomes were prepared from neutral phosphatidylcholine, negatively charged phosphatidic acid and polyethylenglycol bounded to phosphatidylethanolamine. We have managed to prepare stealth liposomes with suitable properties that should guarantee passive targeting without evocation an immune response, despite the content of the negative component. We also found a suitable method of preparation for stealth liposome–TMC complex, where the change of size and zeta potential confirmed the non-covalent bound between two components despite the content of the polyethyleneglycol.

KLÍČOVÁ SLOVA

Fosfatidylcholin (PC), kyselina fosfatidová (PA), stealth liposomy, trimethylchitosan, inhalační podávání, dynamický rozptyl světla, zeta potenciál.

KEY WORDS

Phosphatidylcholine (PC), phosphatidic acid (PA), stealth liposomes, trimethylchitosan, inhalation administration, dynamic light scattering, zeta potential.

SZABOVÁ, Jana. *Příprava a charakterizace komplexních liposomálních systémů pro distribuci léčiv*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113578>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Filip Mravec.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu diplomové práce Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D. za jeho čas, odborné rady, důvěru a pomocnou ruku při řešení této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Jiřímu Smilkovi, Ph.D., Zuzaně Bayerové a Haně Zbořilové za jejich optimismus, přátelství a nasyntetizovaný trimethylchitosan. Mé poděkování patří i Ing. Michalu Kalinovi, Ph.D. za užitečné rady a připomínky v rámci experimentální části. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svojí rodině, přátelům a partnerovi za jejich lásku, objetí a podporu při celém studiu.

Obsah

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Polyelektrolyty	8
2.1.1	Konformace lineárních polyelektrolytů	8
2.2	Chitosan a N, N, N-trimethylchitosan	10
2.2.1	Chitosan a důvody derivatizace	10
2.2.2	Historie N, N, N-trimethylchitosanu	10
2.2.3	Vlastnosti a toxicita N, N, N-trimethylchitosanu	11
2.2.4	Metabolismus N, N, N-trimethylchitosanu	12
2.3	Fosfolipidy	13
2.3.1	Liposomy.....	15
2.3.1.1	Stealth liposomy.....	19
2.3.1.2	Pasivní cílení	19
2.3.1.3	Aktivní cílení.....	20
2.4	Inhalační podávání	21
2.5	Dynamický rozptyl světla.....	21
2.5.1	Velikost	22
2.5.2	Zeta potenciál	23
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	25
3.1	Možné kompozice liposomů	25
3.2	Příprava a složení liposomů v kombinaci s trimethylchitosanem	27
3.3	Popis systému pro distribuci léčiv.....	31
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
4.1	Chemikálie	33
4.2	Příprava vzorků	35
4.2.1	Příprava PBS pufru	35
4.2.2	Příprava koncentrační řady PC ve vodě a PBS pufru	35
4.2.3	Ověření zvolení koncentrace PC pro přípravu liposomů	35
4.2.4	Příprava liposomů z PC s přídavkem 6 mol. % PA	36
4.2.5	Příprava liposomů z PC s přídavkem 20 a 25 mol. % PA.....	36
4.2.6	Příprava liposomů z PC s přídavkem 30 mol. % PA	37
4.2.7	Příprava stealth liposomů (z PC, 30 mol. % PA a 6 mol. % PEG–PE) ..	37

4.2.8	Kombinace stealth liposomu a trimethylchitosanu	37
4.3	Měření a zpracování výsledků.....	38
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	39
5.1	Vhodná koncentrace 15:0 PC a vhodné prostředí	39
5.1.1	Koncentrační řada 15:0 PC ve vodě.....	39
5.1.2	Koncentrační řada 15:0 PC v PBS pufru.....	41
5.1.3	Ověření správného zvolení koncentrace 15:0 PC	41
5.2	Vhodná koncentrace 12:0 PA.....	43
5.2.1	Přídavek 6 mol. % 12:0 PA.....	43
5.2.2	Přídavek 20 a 25 mol. % 12:0 PA	44
5.2.3	Přídavek 30 mol. % 12:0 PA a vliv cholesterolu	45
5.3	Vhodná koncentrace PEG ₅₀₀₀ –PE	46
5.4	Kombinace stealth liposomů s TMC.....	47
5.4.1	Kombinace roztoku stealth liposomů s roztokem TMC	47
5.4.2	Rehydratace fosfolipidového filmu roztokem TMC	54
6	ZÁVĚR.....	56
7	ZDROJE.....	59
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	65
8.1	Seznam zkratk	65
8.2	Seznam symbolů	65
9	PŘÍLOHY	66

1 ÚVOD

V současné době se čím dál tím více začíná upřednostňovat využití inhalačního podávání léčiv, a to především léčiv s peptidovou nebo bílkovinnou povahou. Díky inhalaci se vyhneme degradaci léčiva a také first-pass efektu (efekt prvního průchodu játry). Mezi látky, které by byly schopny umožnit inhalační podávání léčiv patří bezpochyby trimethylchitosan (derivát chitosanu). Ten je díky permanentnímu kladnému náboji dusíku schopný rozpustit se i ve fyziologickém pH. Jeho kladný náboj je schopný umožnit průchod mezi buňkami přes tzv. těsné spoje (tight junction) a dostat tak léčivo do krevního oběhu.

Liposomy jsou jedny z mála nosičových systémů, které jsou povoleny FDA (Food and Drug Administration). S nimi se již můžeme setkat v běžné lékařské praxi, kde se využívají stealth liposomy s navázanými protilátkami např. při léčbě rakoviny prsu (Herceptin®).

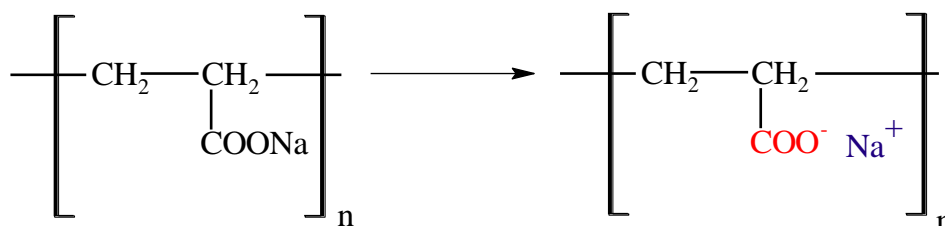
Nekovalentní vazba trimethylchitosanu se záporně nabitými liposomy již byla dokázána v několika člancích [1; 2; 3; 4; 5], nikdo se však nezaměřil na to, zda by docházelo k nekovalentní vazbě při záměně záporně nabitého liposomu za stealth liposom, který by obsahoval ve své struktuře zápornou komponentu. Kombinace stealth liposomu s trimethylchitosanem by měla daleko blíže k biomedicínské aplikaci ve srovnání s kombinací TMC–záporně nabitý liposom. Imunitní systém díky protilátkám a fagocytujícím buňkám umí velmi rychle eliminovat částice s nábojem. Ty tedy nemají dostatečný čas pro zacílení a uvolnění léčiva do chtěného místa. Proto strategie využití stealth liposomů pro kombinaci s trimethylchitosanem je zcela zřejmá.

Zjistit to, zda kladný náboj trimethylchitosanu a záporný náboj liposomu schovaný pod vrstvou polyethylenglykolu je schopný pomocí elektrostatických interakcí vytvořit komplexní liposomální systém pro distribuci léčiv, bude hlavním cílem této diplomové práce.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Polyelektrolyty

Pod pojmem polyelektrolyt rozumíme polymer, který v molekule obsahuje postranní skupiny, které jsou schopné elektrolytické disociace. Díky disociaci nám vznikají **makroionty** a **protiionty**. Makroionty mohou mít kladný náboj (makrokationty) nebo záporný náboj (makroanionty). Protiionty jsou poté nejčastěji nízkomolekulární látky (Na^+ , Cl^- , H_3O^+ , apod.), které slouží k zachování elektroneutrality systému. Protiionty se vyznačují sice nezávislým pohybem, ale díky elektrostatickým silám se nachází nejčastěji v okolí disociovaného řetězce [6]. Na Obr. 1 můžeme vidět příklad vzniku makroaniontu a protiiontu pomocí elektrolytické disociace u synteticky připravovaného polyakrylátu sodného.



Obr. 1: Demonstrace vzniku makroaniontu (červený) a protiiontu (modrý) u polyakrylátu sodného

Pokud jsou kovalentně vázané makrokationty mluvíme o **polykationtech** [6]. Mezi nejznámějšího zástupce polykationtů patří chitosan s velkou hustotou kladného náboje hlavně při nižších hodnotách pH. O tomto polykationtu bude dále pojednáno v kapitole 2.2.

Jestliže jsou kovalentně vázané makroanionty jedná se o **polyanionty**. U polyaniontů najdeme velké množství zástupců jak přírodního, tak syntetického původu [6]. Hyaluronan sodný je jeden z nejznámějších a nejvýznamnějších polyaniontů, který se nachází v celém našem těle (extracelulární matrix, sklivec, synoviální tekutina, chrupavky, ...) [7]. Mezi další přírodní zástupce patří chondroitin sulfát (nacházející se v synoviální tekutině) a alginát (získávaný z řas). Nesmíme zapomenout na zástupce syntetických polyaniontů (polyakrylát sodný, kyselina polystyrensulfonová, poly-N-alkylpyridiniumchlorid), které se nejčastěji používají jako superabsorpční polymery do plenek, vložek apod.

Polyelektrolyty, které obsahují aniontové i kationtové skupiny se nazývají **polyamfolyty**. Jejich makroionty nazýváme makroamfionty [6]. S polyamfolyty se váže pojem izoelektrický bod, který je spojen s určitou hodnotou pH. Při této hodnotě pH dojde k vyrovnaní záporných a kladných nábojů a polyelektrolyt se chová jako nenabitá molekula. Této vlastnosti se využívá při separaci proteinů v elektrickém poli (izoelektrická fokusace), kdy právě proteiny jsou typickými zástupci polyamfolytů [8].

2.1.1 Konformace lineárních polyelektrolytů

Neionizované ohebné lineární makromolekuly zauímají v roztoku tvar klubka, přičemž velikost klubka závisí na délce řetězce a na interakcích krátkého a dalekého rozsahu. U lineárních polyelektrolytů musíme brát v potaz **elektrostatické interakce**, protože ve vodném prostředí dochází k disociaci ionizovatelných skupin. Pokud se nejedná o polyamfolyty, tak všechny makroionty mají stejný náboj. Elektrostatické interakce jsou

poměrně silné, síla F působící mezi dvěma náboji q_1 a q_2 závisí na druhé mocnině jejich vzdálenosti r . Mají ze všech nekovalentních interakcí největší dosah [9].

$$F = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon} \cdot \frac{q_1q_2}{r^2} \quad (2.1)$$

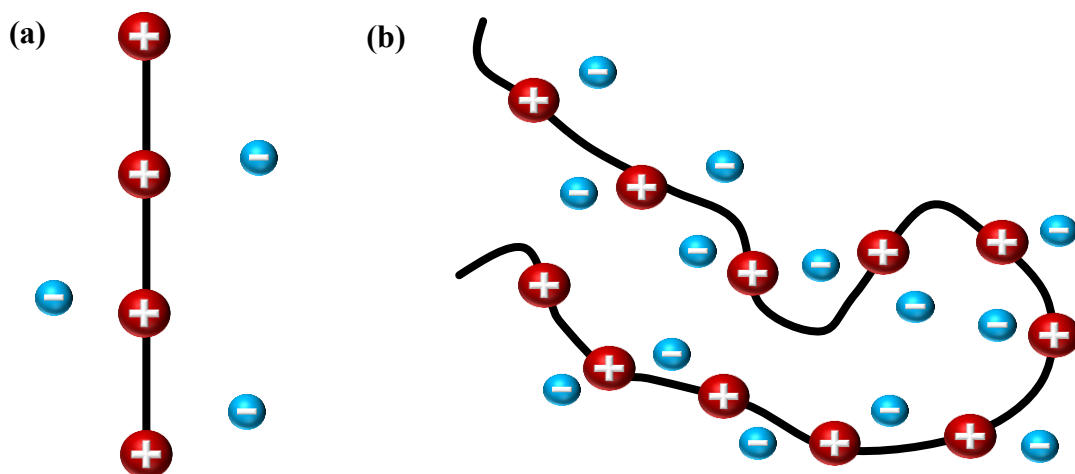
(ϵ_0 – permitivita vakua, ϵ – je relativní permitivita prostředí)

Podle Coulombova zákona (2.1) víme, že elektrostatická síla ubývá s druhou mocninou vzdálenosti, přičemž dosah přitažlivých van der Waalsových sil klesá se sedmou mocninou. Z toho vyplývá, že dosah odpuzivých sil je mnohem větší. Musíme si uvědomit, že dosah elektrostatických interakcí je negativně ovlivněn přítomnými protiionty popřípadě ionty přidaných solí. Dosah elektrostatických interakcí je tím menší, čím větší je koncentrace přítomných iontů. Vliv změny konformace polyelektrolytů ovlivňuje fyzikální vlastnosti roztoků (např. rozpustnost). Na Obr. 2 můžeme vidět dvě vybrané konformace polyelektrolytů v závislosti na jejich koncentraci.

U velmi zředěných roztoků polyelektrolytů bez přítomnosti soli přítomné protiionty mají tendenci oddisociovat od polymerního řetězce. Tím se sníží jejich koncentrace podél řetězce, a sníží se i jejich odstiňující efekt. Souhlasný náboj makroiontů se proto projeví velmi silně a dojde k expanzi klubka do **dlouhé tuhé tyčinky**.

Při vyšší koncentraci polyelektrolytu v nepřítomnosti soli, nám vzroste i koncentrace protiiontů, které jsou schopny odstínit elektrostatické interakce mezi náboji na makromolekule. S rostoucí koncentrací již klesá tendence protiiontů oddifundovat od řetězce. Konformace polyelektrolytu již není tuhá tyčinka, ale zaujímá konformaci **vysoce expandovaného klubka**.

Pokud k velmi zředěnému roztoku polyelektrolytu přidáme sůl, zvýšíme iontovou sílu. Dojde ke zvýšení odstiňujícího efektu protiiontů a polyelektrolyt se chová jako neionogenní polymer (konformace klubka) [6].



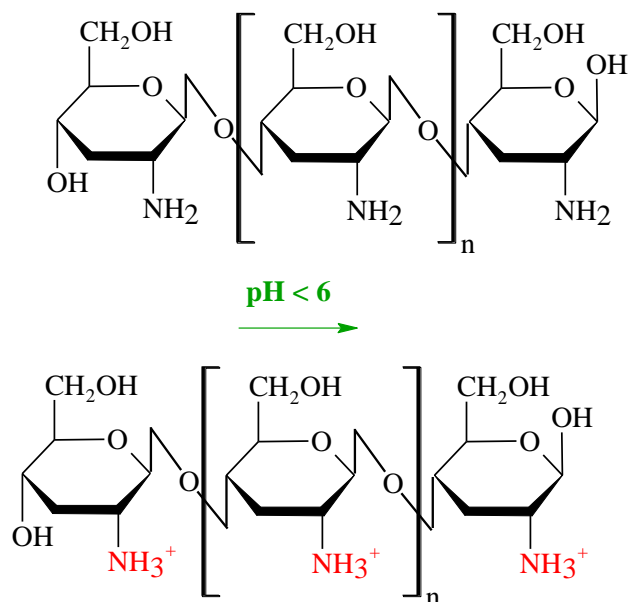
Obr. 2: Různé konformace polykationtu v závislosti na jeho koncentraci. Při nízké koncentraci polykationtu vidíme konformaci dlouhé tuhé tyčinky (a). Při vyšší koncentraci polykationtu je znázorněná konformaci vysoce expandovaného klubka (b).

2.2 Chitosan a N, N, N-trimethylchitosan

2.2.1 Chitosan a důvody derivatizace

Chitosan je přírodní lineární netoxický polysacharid skládající se z **D-glukosaminu**. Tyto jednotky jsou vázány β -(1,4) glykosidickou vazbou, kdy právě tento typ vazby odlišuje vlastnosti chitosanu od zásobních polysacharidů (glykogen, škrob). Chitosan se získává pomocí deacetylace chitinu. Tato deacetylace je možná dvěma způsoby, chemicky díky 50 % hydroxidu sodného nebo enzymaticky působení *N*-deacetylasy. V přírodě nikdy nenajdeme 100 % chitin nebo chitosan, vždy najdeme jejich kopolymer v různém procentním zastoupením obou složek. Jeho velká výhoda je biodegradabilita a biokompatibilita.

Rozpustnost chitosanu ve vodném prostředí je velmi ovlivněna hodnotou pH. K rozpuštění chitosanu dochází v roztocích pouze s nižším pH než 6,0. Pokud pH klesne pod tuto hodnotu, tak dojde ke zvýšení množství ionizovatelných skupin v polymerní struktuře a také k odpuzování shodně nabitých makrokationtů, jak bylo zmíněno v kapitole 2.1.1. Následuje natažení polymeru, což způsobí větší kontakt řetězce s vodou a dojde ke zvýšení rozpustnosti polymeru [10]. Nabití na chitosanovém řetězci je zobrazeno na *Obr. 3*.



Obr. 3: Změna náboje chitosanu při snížení hodnoty pH pod 6

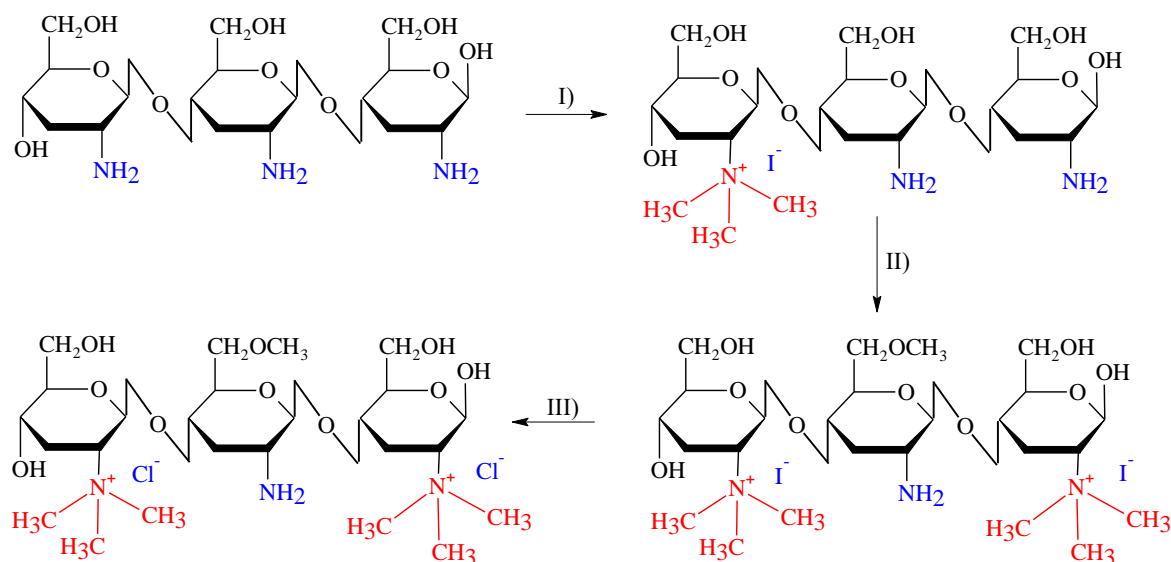
Právě tato vlastnost (rozpustnost pouze v kyselém prostředí) omezuje chitosan v použitelnosti pro biomedicínské aplikace, protože při fyziologických hodnotách ($\text{pH} = 7,4$) je většina chitosanu ve formě sraženiny. Nerozpustnost chitosanu při fyziologickém pH je hlavní důvod, proč je snaha o derivatizaci tohoto biopolymeru. Zavedením tří methylových skupin na aminoskupinu chitosanu je zajištěn jeho kladný náboj i při pH 7,4 a není tak limitováno jeho využití pro biomedicínské aplikace [11].

2.2.2 Historie N, N, N-trimethylchitosanu

Trimethylchitosan (TMC) byl poprvé syntetizován v polovině dvacátého století a v této době byl pojmenován jako Macramin. Posléze byla odhalena jeho antimikrobialita. Mnoho vědců se snažili syntetizovat TMC pomocí různých reakčních schémat. Všechny vědecké

skupiny však narazili na problémy s nízkou rozpustností nebo s rozsáhlou dimethylací. První úspěšná syntéza ve vodě rozpustného TMC s vysokým stupněm kvarternizace a nízkou dimethylací byla dosažena roku 1998 Sievalem a spol. díky použití dvojstupňové methylační reakce. Postup syntézy dle Sievala a spol. je znázorněn na *Obr. 4*.

Britto a Assis roku 2007 syntetizovali TMC díky reakci chitosanu s dimethylsulfátem v alkalickém prostředí, ve výsledném produktu byl pozorován vysoký stupeň O-methylace. Díky přidavku kyseliny mravenčí a formaldehydu do reakční směsi (dimethylsulfát a chitosan) dochází ke vzniku trimethylchitosanu bez O-methylace [12].

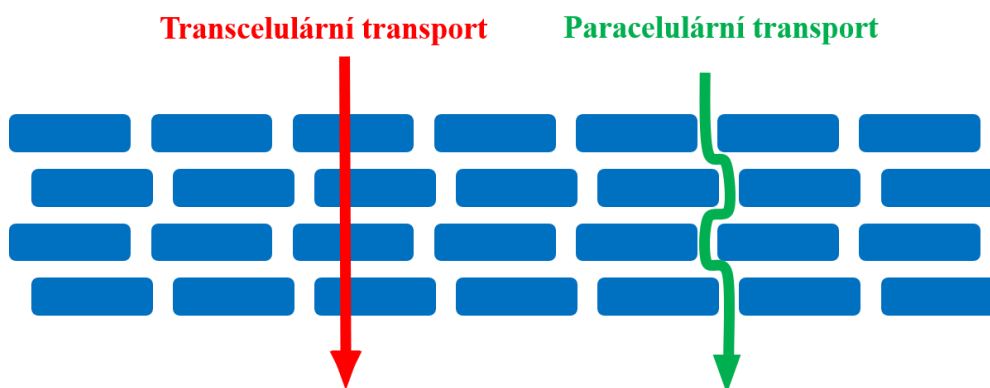


I) CH_3I , NaOH , NaI , Methylpyrrolidin, 60°C II) CH_3I , NaOH , Methylpyrrolidin, 60°C III) vodný roztok NaCl

Obr. 4: Dvoukrokové schéma syntézy TMC dle Sievala a spol.

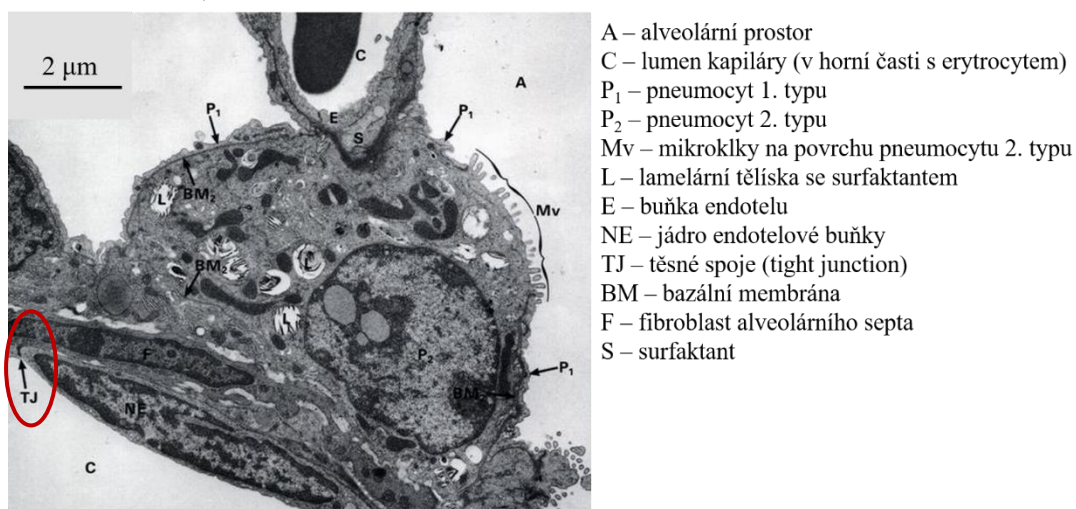
2.2.3 Vlastnosti a toxicita N, N, N-trimethylchitosanu

Trimethylchitosan je polykationt s mukoadhezivními a antimikrobiálními vlastnostmi, který je rozpustný jak v neutrálním, tak v alkalickém prostředí. TMC usnadňuje **paracelulární transport** vysokomolekulárních hydrofilních látek díky kombinaci bioadheze a vratnému **rozrušení těsných spojů** (tight junction TJ) v membráně. TMC nereaguje s komponenty nacházející se na sliznici, a proto neindikuje transcelulární transport [13]. Rozdíl mezi transcelulárním a paracelulárním transportem je zobrazen na *Obr. 5*.



Obr. 5: Rozdíl mezi transcelulárním a paracelulárním transportem

Přesný mechanismus otevírání těsných spojů není ještě zcela objasněn, existují dvě prozatímní teorie. TMC stejně jako většina kladně nabitých makromolekul (protamin, polylysin) mohou interagovat se záporně nabitými složkami glykoproteinu na povrchu epiteliálních buněk (kyselina sialová). Navíc těsné spoje ve své dutině jsou velmi hydratované a obsahují fixní záporný náboj. Změna v relativní koncentraci specifických iontů v těsných spojkách by mohla vést k uvolnění či otevření těchto spojů [10]. Další vysvětlení, jak dochází k otevírání těsných spojů pomocí TMC souvisí s aktivací integrinových receptorů, které se nacházejí na membráně buňky. Tyto receptory by poté měly významně přispět při otevírání těsných spojů [14]. U těsných spojů dochází k úplnému obnovení jejich funkčnosti po 16 hodinách od podání TMC [15]. Těsné spoje se nacházejí i v plicních alveolech (zobrazeno na Obr. 6).



Obr. 6: Snímek alveolu z elektronového mikroskopu se zvýrazněnými těsnými spoji [16]

Co se týká toxicity trimethylchitosanu, tak bylo zjištěno, že se jedná o **netoxický**, biokompatibilní a biodegradabilní polykationt, který je schopný bezpečně zvýšit propustnost léčiv i napříč průduškovou bariérou (potvrzeno in vitro i in vivo testy). Při inhalačním podání TMC nedochází ke vzniku zánětu, ale pouze k mírnému podráždění [15]. Většinu výše zmíněných vlastností má i samotný chitosan, který je nepoužitelný ve fyziologickém prostředí, kvůli důvodům zmíněným v kapitole 2.2.1.

2.2.4 Metabolismus N, N, N-trimethylchitosanu

Přestože se v lidských tkáních nenachází chitin či chitosan, naše tělo disponuje enzymy rozkládající tyto biopolymery – **chitinázy**. Přítomnost chitináz v lidském organismu je poměrně lehce vysvětlitelná. V životním prostředí se nachází velké množství vláknitých mikroskopických hub (plísň). Jednou z jejich hlavních složek buněčné stěny je právě kopolymer chitinu a chitosanu. Pokud se tyto vláknité mikroskopické houby dostanou do organismu inhalací, tak jsou imunitním systémem zneškodněny. Aby nedocházelo k hromadění mrtvých plísň v plicích, tak jsou v organismu přítomné chitinázy, které jsou schopny rozštěpit β -(1,4) glykosidickou vazbu. Glukosaminové jednotky jsou dále jednoduše metabolizovány enzymy přítomnými v našem organismu (např.: sacharidové jednotky mohou být odbourávány pomocí glykolýzy, vazba N–C je rozštěpena lyázy apod.). Mezi další

možnosti, jak se naše tělo může potkat s chitinem či chitosanem je konzumace hmyzu, hub a korýšů [17], kdy rozklad chitinu a chitosanu probíhá v lidském žaludku.

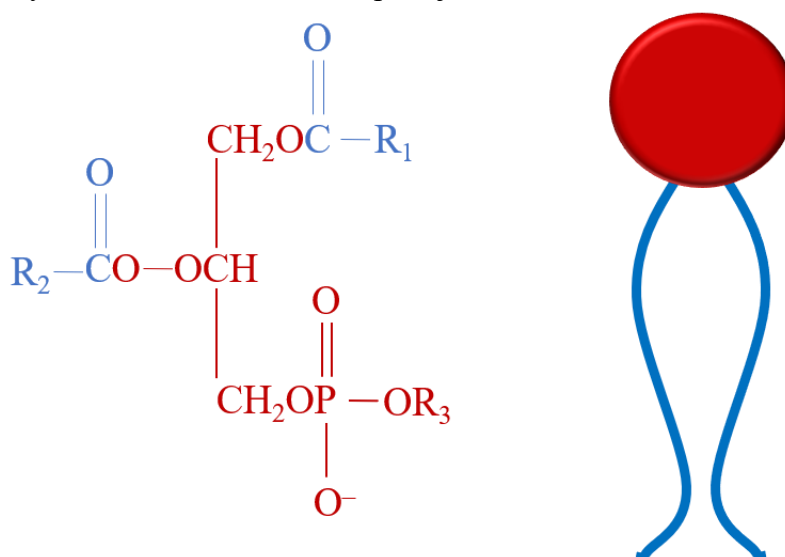
V současné době bylo objeveno 9 chitináz, které se nachází v lidském těle. Jako příklad můžeme uvést **kyselou savčí chitinázu**, která vykazuje vysokou katalytickou aktivitu při pH 2 a která je exprimována v žaludku a v plicích [18]. Kyselá chitináza má s největší pravděpodobností v lidském organismu dvojí funkci – trávení potravin a imunitní odpověď [19]. Množství chitináz v našem organismu lze ovlivnit snížením či zvýšením příjmu potravin s obsahem chitinu či chitosanu. Bylo zjištěno, že lidé, kteří jí dostatek hmyzu, si zvýšili aktivitu chitináz a netrpí astmatem [20].

V předchozí kapitole (2.2.3) bylo řešeno, že po 16 hodinách dochází k obnově těsných spojů. Tento jev by měl být spojen právě s aktivitou chitináz a je závislý na rychlosti odbourávání trimethylchitosanu, který způsobuje otevírání těsných spojů. Pokud by mělo dojít k rychlejšímu uzavření těsných spojů, musí dojít ke zvýšení aktivity chitináz. To je možné např. zvýšením příjmu chitinu či chitosanu v potravě, jak bylo zmíněno výše.

2.3 Fosfolipidy

Fosfolipidy patří mezi složené lipidy a v živém světě se nejvíce nacházejí jako základní stavební jednotky všech biologických membrán. Dále je můžeme najít i v nervové tkáni (přenos vzruchu). Fosfolipidy můžeme rozdělit do dvou skupin, podle toho, od čeho jsou odvozeny. Od glycerolu jsou odvozeny **fosfoacylglyceroly** a od sfingosinu sfingomyeliny [21]. V rámci této práce se budeme dále zabývat pouze fosfoacylglyceroly.

Jako nejjednodušší fosfoacylglycerol a prekurzor ostatních fosfoacylglycerolů se uvádí **kyselina fosfatidová**. Ta je fyziologicky nefunkční, jedná se pouze o metabolický meziprodukt, který vede buďto k výrobě fosfolipidů nebo k výrobě zásobních neutrálních tuků (acylglycerolů), v závislosti na tom, zda máme dostatek buněčných fosfolipidů nebo ne [21]. Obecný vzorec a struktura fosfolipidů je znázorněna na Obr. 7.

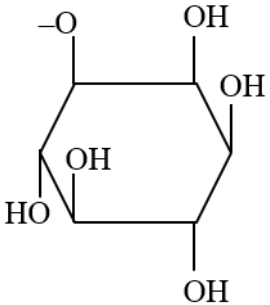


Obr. 7: Obecný vzorec a struktura fosfolipidů

Fosfolipidy ve své struktuře obsahují **glycerol**, jehož první dvě hydroxylové skupiny reagují s **mastnými kyselinami** a tvoří esterovou vazbu. Uhlíkové zbytky R₁ a R₂ (znázorněné na Obr. 7) patří mastným kyselinám, které obsahují 14 až 24 atomů uhlíku a jsou

bud' to nasycené nebo nenasycené (např.: palmitová, stearová, olejová apod.). Poslední hydroxylová skupina glycerolu podstupuje také esterifikaci jen s **kyselinou fosforečnou** [22]. V závislosti na funkční skupině R_3 máme více druhů fosfolipidů, několik příkladů je uvedeno v Tab. 1.

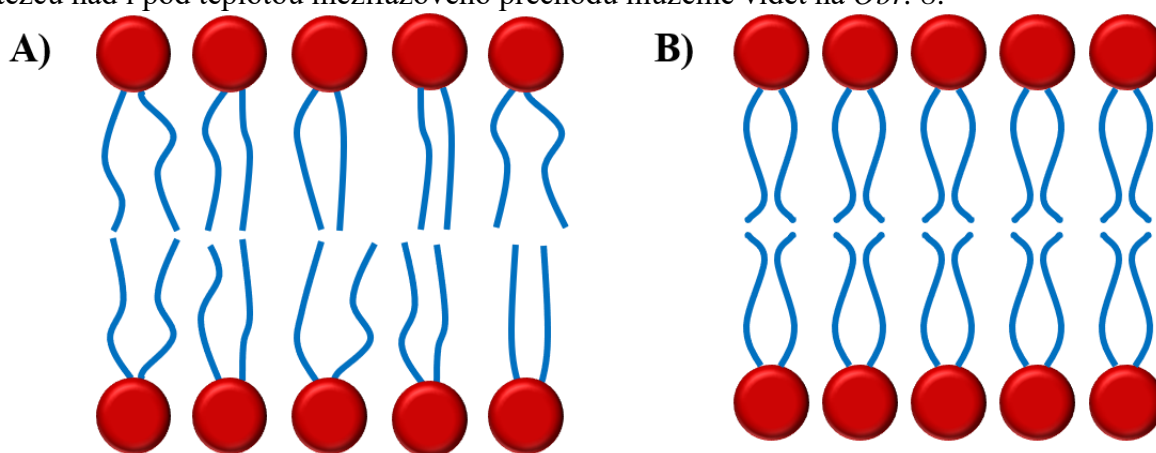
Tab. 1: Příklady některých fosfolipidů v závislosti na funkční skupině (R_3) [22]

název	zkratka	funkční skupina (R_3)
kyselina fosfatidová	PA	$-\text{H}$
fosfatidylcholin	PC	$-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
fosfatidylethanolamin	PE	$-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}_3$
fosfatidylserin	PS	$ \begin{array}{c} -\text{OCH}_2\text{CHCOO}^- \\ \\ ^+\text{NH}_3 \end{array} $
fosfatidylglycerol	PG	$ \begin{array}{c} -\text{OCH}_2\text{CHCH}_2\text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{array} $
fosfatidylinositol	PI	

Díky vazbě nepolárních mastných kyselin (hydrofobní řetězce) a polárního glycerolu, kyseliny fosforečné a příslušných funkčních skupin (hydrofilní hlava) mají fosfolipidy **amfifilní** neboli amfipatický charakter. Tato struktura má samovolnou tendenci se organizovat (agregovat) do různých tvarů (micely, liposomy, rovinné dvojvrstvy) v závislosti na koncentraci, teplotě a typu fosfolipidů. Hydrofilní hlava se nachází na povrchu všech typů struktur, kde pomocí vodíkových můstků a elektrostatických interakcí reaguje s vodným prostředím. Hydrofobní řetězce poté tvoří vnitřní nepolární kontinuum [9].

Lipidovou dvojvrstvu můžeme chápat jako dvojrozměrnou viskózní kapalinu (s viskozitou asi 100krát větší, než je viskozita vody). Za fyziologických podmínek se tedy nejedná o pevné těleso, lipidy nemají pevné místo v mřížce a volně se pohybují. Nejedná se o žádný nezvyklý proces, fosfolipid si místo se svým sousedem vymění až 10^7 krát za sekundu. Fosfolipid je dokonce schopný za 1 minutu urazit vzdálenost přibližně $1\text{ }\mu\text{m}$ (**laterální pohyb**) [23]. Ve dvojvrstvě není omezen ani rotační pohyb. Nejvíce diskutovaným pohybem u lipidických molekul je překlopení molekuly (**flip–flop**). U umělých membrán nebyl tento pohyb pozorován, u přirozených ve velmi malé míře. Hlavním důvodem je vysoká aktivační energie flip–flop pohybu, protože polární hlava musí projít přes nepolární oblast tvořenou uhlovodíkovými řetězci. Proto se předpokládá existence enzymu, který by tento pohyb umožňoval [9].

Aby byla membrána kapalná za fyziologických podmínek, tak fyziologická teplota musí být vyšší než teplota tání lipidů tzv. **teplota mezifázového přechodu T_m** . Tato teplota je závislá na struktuře lipidů. Pokud je okolní teplota vyšší než teplota mezifázového přechodu, tak se řetězce vyznačují vysokou pohyblivostí, mají dostatečnou energii pro rotaci vazeb a ohebné řetězce se krouť. I tak je membrána stále vysoce organizovaná, nerozpadá se a popisujeme ji jako **kapalný krystal**. Před teplotou mezifázového přechodu se řetězce mastných kyselin vyznačují nízkou pohyblivostí, kroucení klesá, a membrána se nachází ve formě **gelu**. Teplota tání lipidů roste s délkou řetězce, protože hydrofobní interakce mezi delšími řetězci jsou silnější než mezi kratšími [23]. Znázornění ohebnosti uhlovodíkových řetězců nad i pod teplotou mezifázového přechodu můžeme vidět na Obr. 8.



Obr. 8: Znázornění lipidové dvojvrstvy ve formě A) kapalného krystalu B) gelu

Teplota mezifázového přechodu může být ovlivněna i strukturním prvkem, který brání uspořádání hydrofobních řetězců. Proto jsou fosfolipidy, které obsahují ve své struktuře dvojné vazby schopny vytvořit lipidovou dvojvrstvu ve formě kapalného krystalu při nižších teplotách než lipidy s vazbami nasycenými. V membránách se nacházejí také steroly, mezi které patří **cholesterol**. Ten je z převážné většiny hydrofobní, jediná jeho hydrofilní část je hydroxylová skupina $-OH$. Cholesterol opět rozrušuje uspořádání řetězců, stejně jako dvojné vazby v mastných kyselinách, a brání přejít membráně do fáze gelu, tedy snižuje T_m [23].

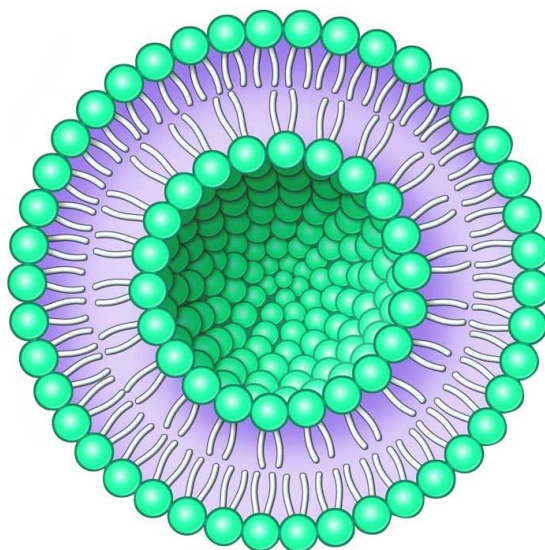
I fluidita membrán lze regulovat. Zpevnění membrány je možné již zmíněným cholesterolem (při přidavku nad 30 % celkového množství lipidů v membráně), který má poměrně rigidní strukturu. Díky tomu se sníží laterální pohyblivost fosfolipidů a zvýší rigidita. Snížení rigidity je možné i díky začleňováním nenasycených mastných kyselin. Dvojné vazby v mastných kyselinách jsou v konfiguraci cis, jsou tedy neskladné a nevytvoří tak kompaktní strukturu [9].

2.3.1 Liposomy

Začátkem padesátých let 20. století bylo zjištěno, že jednoduchá hydratace suchého lipidového filmu na skleněném povrchu má za následek vznik sférických vezikul (liposomů). Toto pozorování umožnilo vývoj liposomů a lipidových nanočástic jako nosičů léčiv. V dnešní době jsou liposomy stěžejním biokompatibilním a biodegradovatelným nosičovým systémem. Léčiva se mohou nacházet ve vodném jádře nebo v hydrofobní dvojvrstvě. Začlenění léčiv tímto způsobem je z důvodu chránění zdravé tkáně, zatímco lék putuje

do potřebného místa. Kromě snížení toxicity léčiva je fosfolipidová dvojvrstva schopná ochránit léčivo před hydrolýzou nebo oxidací [24].

Liposomy jsou mikronové nebo nanometrické vezikuly skládající se z amfifilních částic (lipidy, fosfolipidy), které spontánně formují jednu (**unilamelární** – SUV, LUV) nebo více (**multilamelární** – MLV) vrstev, které ohraničují vodné prostory. Právě v závislosti na množství vrstev amfifilních částic mohou mít liposomy velikost od 20 nm do několika mikrometrů [25]. Tloušťka jedné fosfolipidové vrstvy se pohybuje v rozmezí 3–6 nm v závislosti na délce a struktuře obsažených lipidů [24]. Na Obr. 9 můžeme vidět strukturu SUV/LUV liposomu, kdy SUV a LUV liposomy jsou unilamenární vezikuly lišící se pouze svojí velikostí. SUV liposomy mají obecně velikost v rozmezí 20–100 nm. O LUV liposomech mluvíme, pokud vezikuly mají velikost v rozmezí 100–250 nm [26].



Obr. 9: Struktura SUV/LUV liposomu [27]

Formulace liposomů z fosfolipidů je možná díky **hydrofobnímu efektu**. Hydrofobní interakce se projevují pouze ve vodném prostředí, tedy jedním z interakčních partnerů musí být vždy voda. Hydrofobní sloučeniny mají tendenci vytvářet ve vodě agregáty kvůli snížení kontaktu s vodným rozpouštědlem a vytvoření termodynamicky výhodnější struktury.

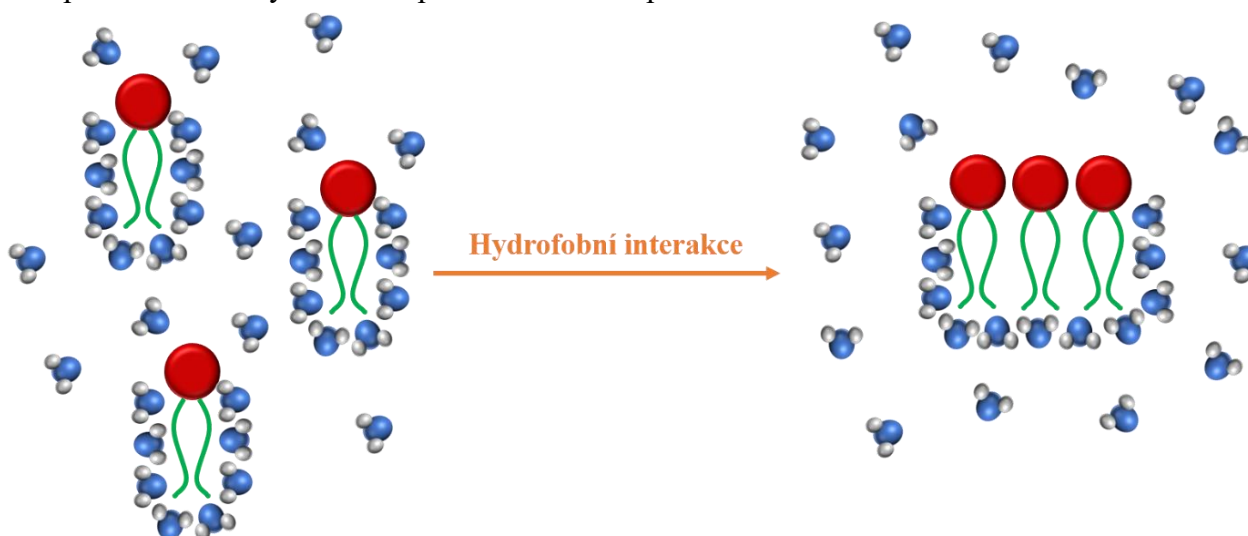
To, zda bude docházet ke vzniku vazby, záleží na změně **Gibbsovy energie**, která je uvedena v rovnici (2.2). Ta má dva hlavní členy a to **enthalpický**, který zahrnuje vznik a zánik nekovalentních interakcí a **entropický**, který bere do úvahy uspořádanost a neuspořádanost systému:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S, \quad (2.2)$$

kdy ΔG – změna Gibbsovy energie, ΔH – změna enthalpie, ΔS – změna entropie, T – termodynamická teplota.

Ač by se mohlo zdát, že hnací silou hydrofobních interakcí jsou přitažlivé síly mezi hydrofobními řetězci (enthalpický příspěvek), tak naopak hlavní slovo u hydrofobních interakcí má entropický člen. Voda je v přítomnosti samotných hydrofobních řetězců daleko více uspořádaná, a proto je entropie vody nižší, než když máme agregát (např. liposom), kdy nepolární řetězce nejsou v kontaktu s vodou a ta tedy může být více neuspořádaná

(termodynamicky výhodnější) [9]. Na *Obr. 10* můžeme vidět zmíněné zvýšení neuspořádanosti vody vlivem uspořádáním fosfolipidů.



Obr. 10: Znázornění zvýšení entropie vody při hydrofobním efektu

V závislosti na kompozici fosfolipidů mohou liposomy nést kladný, záporný i neutrální náboj. Tento náboj se nejčastěji označuje jako **zeta potenciál** (viz 2.5.2). Fosfolipidy bez náboje mají větší tendenci agregovat než fosfolipidy s nábojem. Biologický původ a hustota náboje hraje taktéž roli v otázce stability, farmakokinetiky, biodistribuce, buněčné afinity a včlenění léčiva. Obecně je známo, že nabitě fosfolipidy v liposomech zvyšují „**clearance**“ (množství krve, které se za jednotku času očistí od určité látky [28]). Nabité částice jsou subjektem pro protilátky tzv. **opsoniny**, které označují částice určené k fagocytóze (v případě liposomů – liposomální opsonizace) [29]. Obecně můžeme říct, že jakýkoliv liposom různého složení s různou hustotou náboje může být cílem pro různé opsoniny [30]. Avšak i malé množství nabitých lipidů může stabilizovat neutrální liposomy před agregací a snížit tak pravděpodobnost fagocytózy na základě agregace [31].

Velikost liposomů ovlivňuje farmakokinetiku, distribuci v tkáních a „clearance“. Pouze liposomy o velikosti menší nebo rovno než 100–150 nm jsou schopné vstoupit do fenestrovaných cév v játrech nebo do nádorů (viz odstavec 2.3.1.2). Liposomy těchto velikostí neuniknou z krevních kapilár do plic, srdce nebo ledvin [32]. Ukažme si to na příkladu alveolu – plicního sklípku. Přestože jsou alveoly schopné zachytit částice i o velikosti několika mikrometrů, tak velikost pórů v plicní kapiláře se odhaduje kolem 35 nm. Částice o velikosti 100–150 nm tedy nejsou schopné bez pomoci projít póry z kapiláry do alveolu (či naopak). Částice v tkáních mohou zůstat déle nebo jsou přeneseny fagocytozujícími buňky do sleziny nebo jater, kde jsou eliminovány z organismu [33].

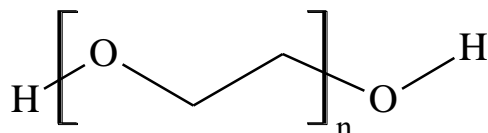
Souhrn základních metod přípravy liposomů a možnosti redukce jejich velikosti jsou shrnuty v *Tab. 2*. Zároveň jsou uvedeny i některé výhody a nevýhody u všech vybraných metod.

Tab. 2: Souhrn vybraných metod přípravy liposomů a možnosti pro redukci jejich velikostí [24]

Metody přípravy	Popis	Výhody	Nevýhody
Hydratace fosfolipidového filmu	Odpaření rozpouštědla a následná hydratace vodnou fází	Jednoduché	Vyžaduje redukci velikosti Vícekový proces
Odpaření reverzní fáze	Vytvoření emulze smícháním nemísitelného rozpouštědla s vodnou fází a následné odpaření rozpouštědla	Jednoduché	Vyžaduje redukci velikosti Vícekový proces
Injekční (ethanolové) vstřikování	Vstřikování mísitelného rozpouštědla (ethanolu) do vodné fáze	Jednokrokový proces Průběžný proces	Přítomnost dalšího rozpouštědla Všechny lipidy nejsou rozpustné v ethanolu
Detergentová metoda	Tvorba směsných micel s detergentem s následným odstraněním detergentu	Šetrné	Přítomnost detergentu
Superkritická fluidní metoda	Solvatace lipidů v superkritickém oxidu uhličitém a následná injekce do vodní fáze při nízkém tlaku	Bez organického rozpouštědla Sterilní	Drahé vybavení
Metody redukce velikosti	Popis	Výhody	Nevýhody
Sonifikace	Použití ultrazvukové energie pro narušení vezikul	Jednoduché	Špatná reprodukovatelnost Polydisperzita
Nízkotlaká extruze	Protlačení přes filtr s definovanou velikostí pórů	Monodisperzní Reprodukovatelné Průběžný proces	Zanášení membrány Obtížné udržení teploty

2.3.1.1 *Stealth liposomy*

Hydratací povrchu liposomů můžeme zamezit jejich agregaci a také snížit vychytávání fagocytozujícími buňkami. Bylo zjištěno, že **polyethylenglykol** (PEG) konjugovaný s lipidy zajistí dostatečnou povrchovou hydrataci. Proces, kterým zavádíme PEG do liposomů se nazývá pegylace [34]. Polyethylenglykol je nejčastěji navázán na koncový amin fosfatidylethanolaminu (PE), avšak může být navázán i na cholesterol [24]. Strukturu PEG můžeme vidět na *Obr. 11*.



Obr. 11: Struktura polyethylenglykolu

Liposomy obsahující PEG na svém povrchu se nejčastěji nazývají stealth liposomy, stéricky stabilizované liposomy nebo dlouhodobě cirkulující liposomy. Tyto názvy si zasloužily díky tomu, že výrazně **sníží vazbu opsoninů** a následnou fagocytózu makrofágy, dále také „clearance“ a eliminaci [35]. Snížení vazby opsoninů je důsledkem dostatečné povrchové hydratace, kdy opsoniny se nemohou navázat na liposomy, které mají na povrchu imobilizovanou vodu [36]. Výsledky různých studií ukazují, že nejlepší množství PEG v liposomech je 5–10 mol. % z celkového množství lipidů. V závislosti na typu PEG, dochází ke vzniku vrstvy na povrchu liposomů široké přibližně 5 nm [24].

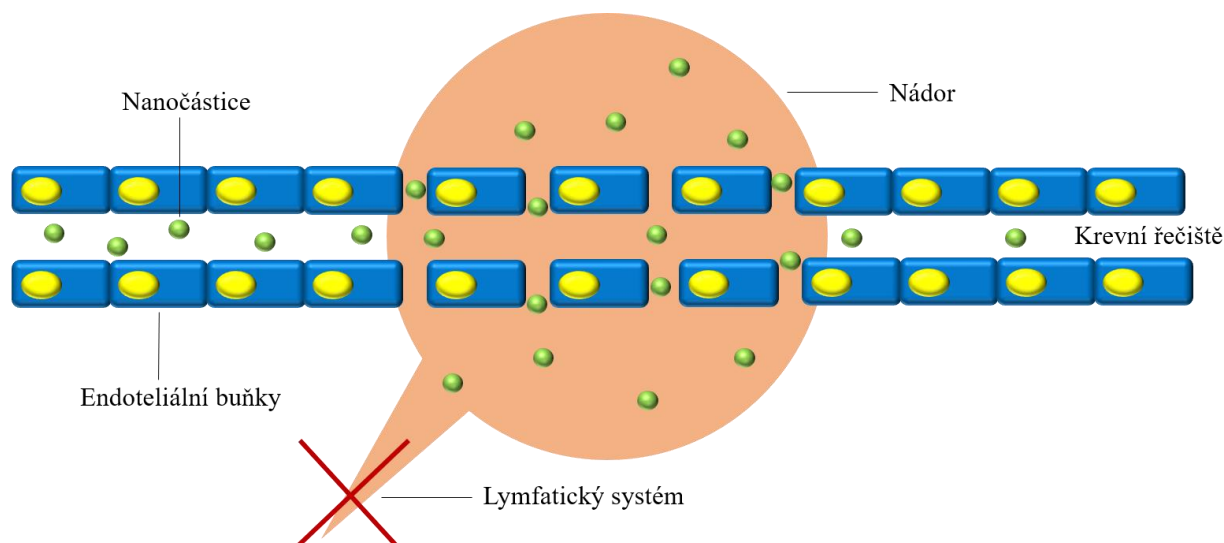
PEG je lineární netoxický, flexibilní hydrofilní polymer, který je schopný překrýt povrchový náboj liposomů. U překrývání náboje liposomů hraje velmi významnou roli **chemický původ** látek nesoucí náboj [37]. Je to z důvodu toho, že opsoniny různých molekulových hmotností se vážou na různě nabitě částice a zajišťují „clearance“ korespondujících liposomů. Opsoniny malých velikostí jsou schopné projít přes PEG i s velkou molekulovou hmotností. Středně velké opsoniny projdou pouze přes PEG o nižší molekulové hmotností a velké opsoniny neprojdou ani přes vrstvu nízkomolekulárního PEG [38]. Z toho vyplývá, že u různě nabitých liposomů musí mít PEG příslušnou molekulovou hmotnost, aby se zabránilo okamžité endocytóze.

PEG je sice rozpustný, ale není degradovatelný, naše tělo není schopno odbourat typy vazeb nacházejících se v PEG. Proto eliminace probíhá pomocí ledvin, kdy dochází k přefiltrování látek, které jsou rozpuštěné v krvi. Ledviny jsou schopny odstranit z těla rozpustné nebiodegradovatelné polymery do molekulové hmotnosti 60 000 g/mol. Pokud je molekulová hmotnost vyšší, tak dochází ke kumulaci látek v ledvinách.

2.3.1.2 *Pasivní cílení*

Pasivní cílení je založeno především na **EPR efektu** (Enhanced Permeability and Retention = zvýšená propustnost a retence). V okolí nádoru roste krevní řečiště velmi rychle, a proto je méně organizované a **více pórovité** na rozdíl od normální tkáně. Proto dochází ke vzniku mezer v tkáni o velikostech od 200 nm do 1,2 μm . Touto nepravidelnou tkání pasivně procházejí částice v řádech několika set nanometrů. Navíc díky nedostatečné funkčnosti lymfatické sítě v nádorových buňkách je zabráněno odstranění přebytečného množství tekutin a živin z nádoru. Kombinace výše zmíněných dvou efektů vede

k nadměrnému propouštění a akumulaci nanočástic v nádoru (nefunkčnost lymfatického systému) [39]. Schématické znázornění EPR efektu můžeme vidět na *Obr. 12*.



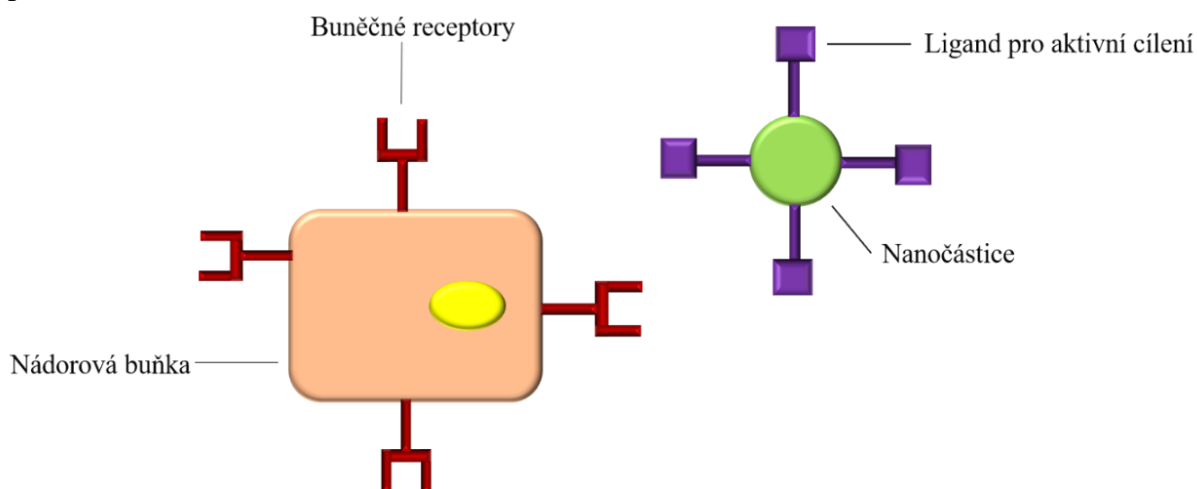
Obr. 12: Schématické znázornění EPR efektu, kdy červený křížek značí nefunkčnost lymfatického systému

Většina látek je kumulována v nádorové tkáni o koncentraci 5–10× větší, než je koncentrace v krevní plazmě. Částice, které jsou čistě záporné jsou vychytávány v játrech. Pokud mají částice vysoký povrchový náboj, spouští koagulační kaskádu, která může v nejhorších případech vést k smrti [39].

Účinek EPR neprobíhá ve všech nádorech stejně, je zde určitá heterogenita mezi typy nádorů. EPR efekt je velmi pomalý děj, který vyžaduje, aby liposomální komplex byl v krvi přítomen po delší dobu. Bez prodloužení plazmatické životnosti liposomálních komplexů díky PEG by nemohl EPR efekt proběhnout [40].

2.3.1.3 Aktivní cílení

Aktivní cílení je založeno na specifické bimolekulární interakci mezi látkou a tkání, buňkou či intracelulární organelou. Tento druh cílení je možné aplikovat pouze na nádory, které se liší určitými vlastnostmi (množství receptorů, přítomnost určitých typů receptorů apod.) od normálních tkání.



Obr. 13: Schématické znázornění aktivního cílení

Jako látky, které se používají pro aktivní transport, můžeme uvést např. protilátky, peptidy, aptamery nebo malé molekuly, které rozpoznávají antigeny specifické pro mikroprostředí nádorů (aminokyseliny, sacharidy apod.) [39]. Aktivní cílení je schematicky znázorněné na Obr. 13.

Aktivní cílení můžeme rozdělit do tří fází, a to primární, sekundární a terciální. Primární cílení se týká doručení léčiva do vybraných tkání a orgánů. Pouze část celkového množství léčiva se z krevního řečiště dostane do těchto tkání a orgánů. Sekundární cílení popisuje průnik léčiva do buněk nacházejících se v těchto tkáních a orgánech. Terciální cílení se týká dopravení léčiva do subcelulární organely [41].

2.4 Inhalační podávání

Lokální podávání léčiv do plic je nutné u pacientů se specifickými plicními chorobami jako jsou cystická fibróza, astma, chronické plicní infekce nebo rakovina plic. Hlavním pozitivem inhalačního podávání je snížení vedlejších účinků a vyšší dávky použitých léčiv v místě účinku. Ač se jednoduchá inhalační zařízení a aerosoly používají od 19. století pro léčbu respiračního traktu, tak až v nedávné době se zvýšil zájem o možnost podávání léčiv inhalační cestou. Hlavní důvod pro zvýšení zájmu o tuto metodu absorpce léčiv je potenciální použitelnost plic jako možnost vstupu léčiv na bázi peptidů a proteinů [42].

Velkou výhodou plic je to, že nabízí velkou plochu pro absorpci léčiv (přibližně 100 m²), tenkou absorpční membránu (0,1–0,2 μm), a je zde zvýšený průtok krve (5 l/min), který je schopný velmi rychle roz distribuovat léčivo v celém těle. Kromě toho plíce disponují nízkou metabolickou aktivitou a na rozdíl od perorálního podávání nedochází k **first-pass efektu** [42]. Volně můžeme tento efekt přeložit jako účinek prvního průchodu játry, kdy dochází ke snížení účinku léku vlivem toho, že jeho část je před vstupem do systémové cirkulace metabolizována v játrech presystémovým metabolismem [43].

Pro inhalační podávání je ideální velikost vdechovaných částic v rozmezí **0,5–5 μm**. Pokud by částice byly větší než 5 μm, tak by docházelo k jejich usazování v orofarynxu (část hltanu za dutinou ústní [44]), ze kterého by byly částice velmi rychle odstraněny. V případě, že by byly částice menší než 0,5 μm, tak by nemuselo vůbec docházet k jejich usazování a mohly by být zpětně vydechnuty [42].

2.5 Dynamický rozptyl světla

Dynamický rozptyl světla (DLS – dynamic light scattering) je jednoduchá neinvazivní metoda, proveditelná v běžných laboratorních podmínkách bez předchozí kalibrace. Díky této technice jsme schopni určit velikost částic, popřípadě jejich distribuci. Pokud měření probíhá v elektrickém poli, jsme schopni určit i zeta potenciál částic. Typicky se používá pro měření emulzí, micel, polymerů, proteinů a nanočástic [45].

Dynamický rozptyl světla je také někdy označován jako kvazielastický rozptyl světla (QELS). Tento druhý název si technika zasloužila díky tomu, že při měření jsou částice v neustálém tepelném pohybu a tím odchází ke změně frekvence dopadajícího a odraženého záření – **Dopplerův jev** [46].

Při měření velikosti částic měříme tzv. hydrodynamický průměr. To je průměr hypotetické tvrdé koule, která difunduje se stejnou rychlostí jako měřená částice. V koloidních disperzích jen velmi zřídka existují systémy ve formě tvrdé koule, proto je toto měření hypotetické [47].

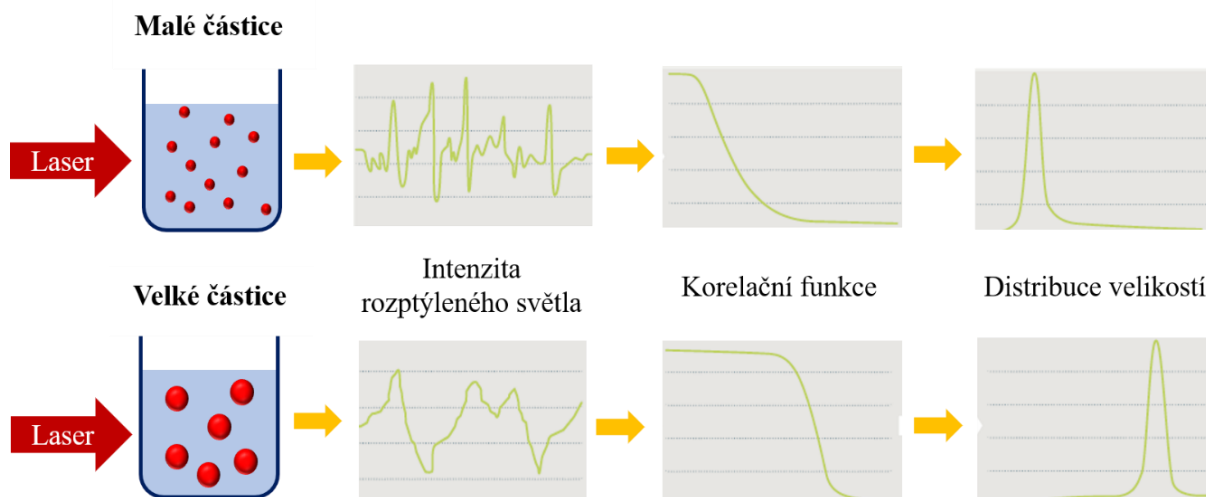
2.5.1 Velikost

Základním principem měření DLS je to, že jsou částice v neustálém náhodném pohybu – **Brownův pohyb**. Rychlost tohoto pohybu je ovlivněna velikostí částic, menší částice se pohybují rychleji než velké. Díky změření rychlosti tohoto pohybu bychom byli schopni určit velikost zkoumaných částic. Pro změření této rychlosti je třeba posvítit na částice laserem.

Částice nám rozptýlí světlo, které je snímáno pod určitým úhlem. Rozptýlené světlo od měřených částic podléhá interferencím konstruktivním nebo destruktivním. V důsledku náhodného neustálého pohybu částic dochází ke změnám vzdáleností mezi částicemi a tím i k fluktuaci intenzity rozptýleného světla s časem [48]. To je analyzováno autokorelátorem, který vytvoří korelační křivku (viz *Obr. 14*) [49]. Z ní jsme schopni získat hydrodynamický průměr d_H na základě znalosti teploty při měření T a viskozity rozpouštědla η_0 pomocí **Stokes–Einsteinovy rovnice**:

$$d_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 D}, \quad (2.3)$$

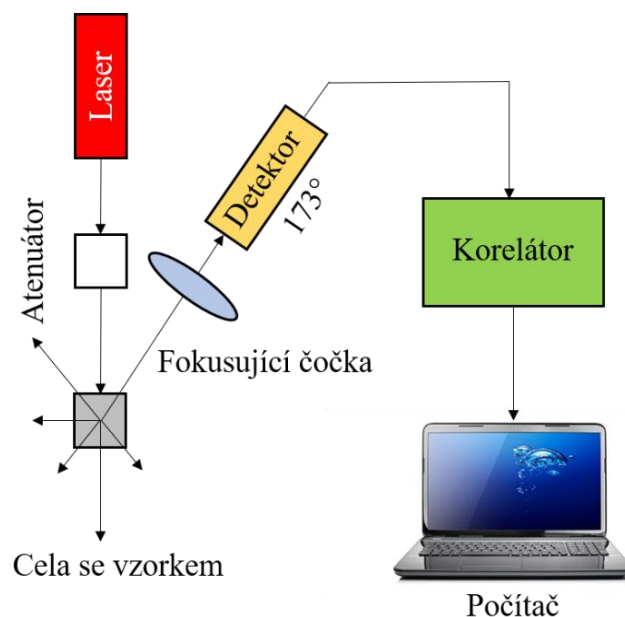
kde k_B – Boltzmanova konstanta a D – difúzní koeficient [45].



Obr. 14: Rozdílnost časové fluktuace intenzity rozptýleného světla a korelační křivky u malých a velkých měřených částic [49]

Jedna z nejdůležitějších částí instrumentace pro měření velikosti je bezpochyby laser, který zajišťuje dopadající záření, které je rozptylováno částicemi. Nejčastěji se používá He–Ne laser o vlnové délce 633 nm, občas se používá i zelený laser o vlnové délce 532 nm. Záření je rozptylováno částicemi do všech stran. Detektor se nachází nejčastěji pod úhlem 173° pro detekci i zpětného rozptylu a vyhnutí se detekci přebytného přímého rozptylu. Díky tomu jsme schopni detekovat rozptyl i velmi malých částic. Jako detektor se využívá fotodioda [45].

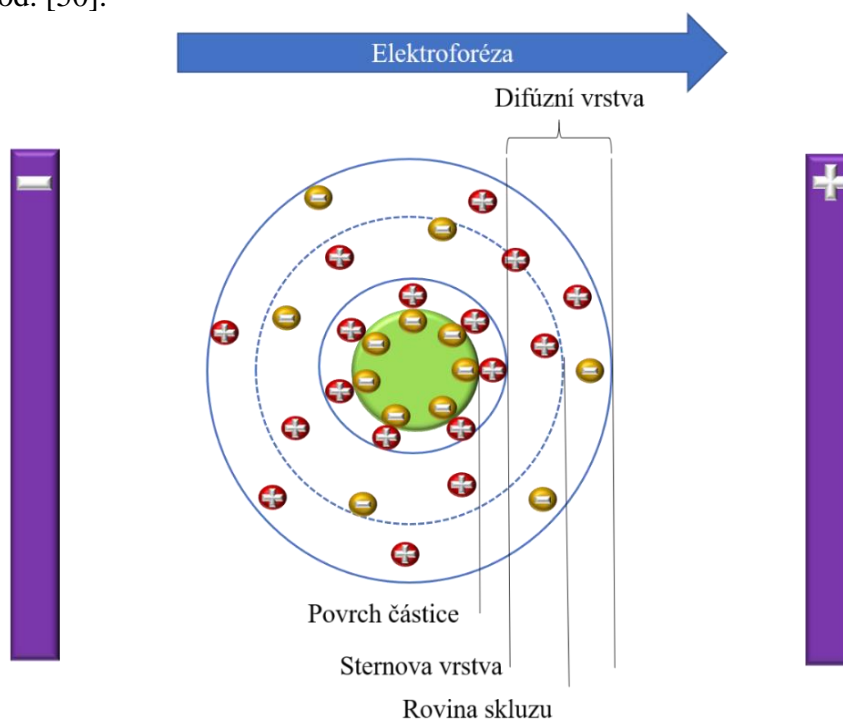
Aby mohl detektor úspěšně změřit intenzitu rozptýleného světla, musí být světlo v určitém rozsahu. Proto se používá atenuátor, který sníží intenzitu dopadajícího záření (laseru). Korelátor srovnává intenzitu rozptylu po sobě jdoucích měření, aby odvodil rychlost, se kterou dochází ke změně intenzity. Informace z korelátoru jde do softwaru Zetasizeru, kde pomocí zadaných parametrů (T , η_0) dojde k odvození velikosti částic [45]. Celkové schéma přístroje je na *Obr. 15*.



Obr. 15: Schématické zobrazení instrumentace DLS pro měření velikosti

2.5.2 Zeta potenciál

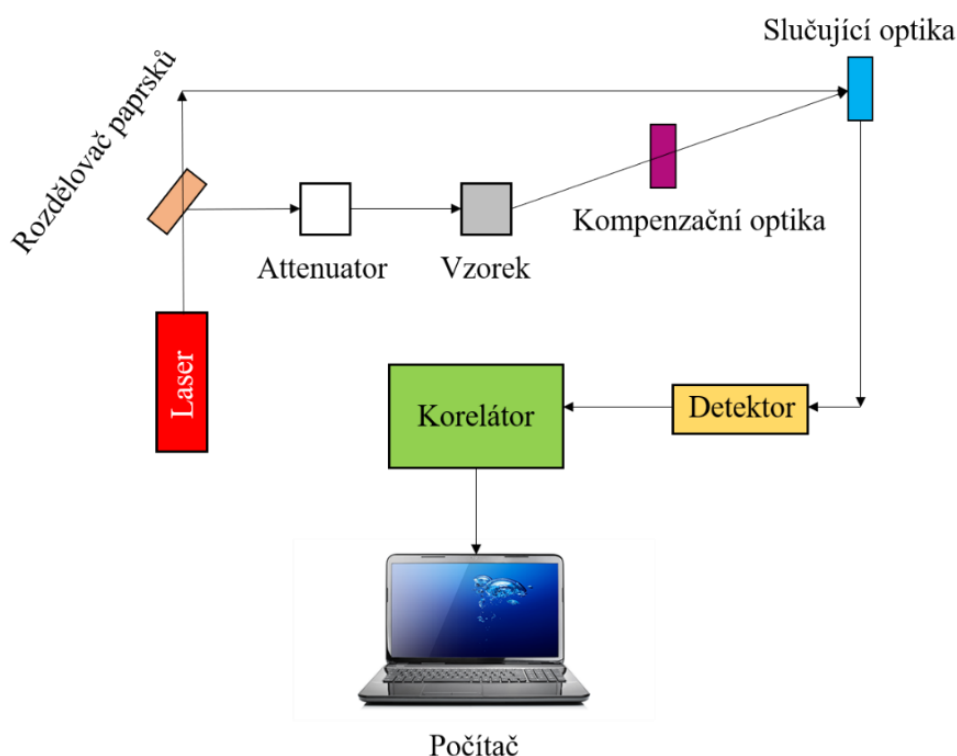
Pro správné pochopení toho, co je zeta potenciál musíme nejdříve pochopit co je to **elektrická dvojvrstva**. Pokud je nabitá částice dispergována v prostředí, tak dochází ke vzniku elektrické dvojvrstvy, která se skládá ze dvou vrstev. Vnitřní část této dvojvrstvy je složena převážně z iontů s opačným nábojem, než má dispergovaná částice. Tato vrstva je pevně vázaná k částici a nazývá se **Sternova vrstva**. Nad touto vrstvou se nachází **difúzní vrstva**, kde jsou už i stejně nabitě molekuly jako je dispergovaná částice. V této vrstvě jsou částice vázány méně pevně. Kompozice difúzní vrstvy se liší v závislosti na pH, iontové síle, koncentraci apod. [50].



Obr. 16: Zobrazení jednotlivých částí elektrické dvojvrstvy

Pokud na disperzi aplikujeme elektrické pole, tak nabité částice se začnou pohybovat k opačně nabitě elektrodě (elektroforéza). V difúzní vrstvě je hypotetická rovina, která působí jako rozhraní mezi pohybem částice a vrstvy rozpouštědla. Toto rozhraní se označuje jako **rovina skluzu**, kdy zeta potenciál je potenciál na této rovině mezi částicí a rozpouštědlem. Zeta potenciál se také může označovat jako elektrokinetický potenciál [45]. Na *Obr. 16* můžeme vidět jednotlivé části elektrické dvojvrstvy a také to, kde najdeme rovinu skluzu u měřené částice.

Při samotném měření zeta potenciálu je na vzorek aplikováno elektrické pole. Mobilní částice během elektroforézy rozptylují dopadající laser. Díky pohybu částic dochází ke změně frekvence původního a rozptýleného záření – Dopplerův jev (viz 2.5). Kvůli tomu je původní laserový paprsek rozdělen na dvě části. Jedna část je fokusována na vzorek a druhá slouží jako reference. Rozptýlené světlo ze vzorku je následně modulováno kvůli určení Dopplerova jevu. Při pohybu částic vlivem působení elektrického pole, dojde ke kolísání intenzity rozptýleného světla s frekvencí úměrnou rychlosti částic. V softwaru Zetasizer Nano je vytvořeno frekvenční spektrum, ze kterého lze vypočítat elektroforetickou pohyblivost, a tedy i zeta potenciál [45]. Na *Obr. 17* můžeme vidět celkové schéma přístroje pro měření zeta potenciálu.



Obr. 17: Schématické zobrazení instrumentace pro měření zeta potenciálu

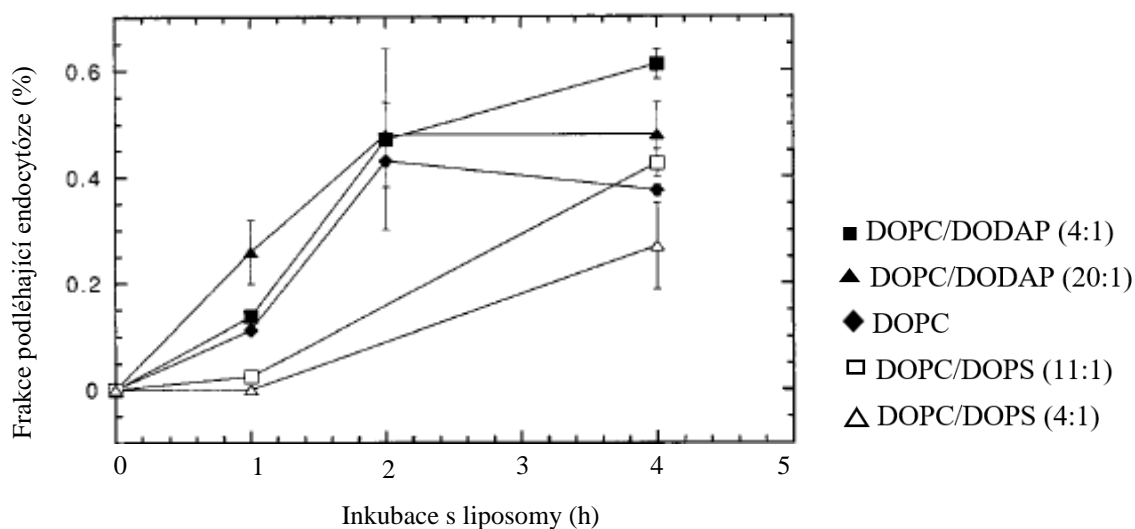
Pomocí zeta potenciálu jsme schopni určit, zda se jedná o stabilní nebo nestabilní disperzi. Pokud se zeta potenciál disperze nachází v rozmezí od **–30 mV do 30 mV**, tak se jedná o nestabilní disperzi, kdy odpudivé elektrostatické síly nejsou dostatečné a dochází k agregaci částic. Zda se zeta potenciál disperze nachází pod či nad tímto rozmezím tak mluvíme o stabilní disperzi a elektrostatické síly jsou dostatečné pro zabránění agregace [49].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Možné kompozice liposomů

Stensrud G. a spol. se zabývali účinkem gama záření na složení liposomů, které byly následně testovány s buněčnými liniemi. Pomocí testu cytotoxicity a inhibice růstu bylo zjištěno, že gama záření má toxické účinky na liposomy, které jsou složeny z nenasycených fosfolipidů. Myší fibroblastová buněčná linie (L 929) byla méně ovlivněna účinky ozářených liposomů z nenasycených fosfolipidů ve srovnání s makrofágovou buněčnou linií (RAW 264). Oproti tomu liposomy, které byly složeny z nasycených fosfolipidů byly pro obě linie netoxické i přes použití gama záření. Díky tomu můžeme říct, že gama záření je vhodné jako sterilizační metoda pro sterilizaci liposomů, které jsou složeny z nasycených fosfolipidů [51].

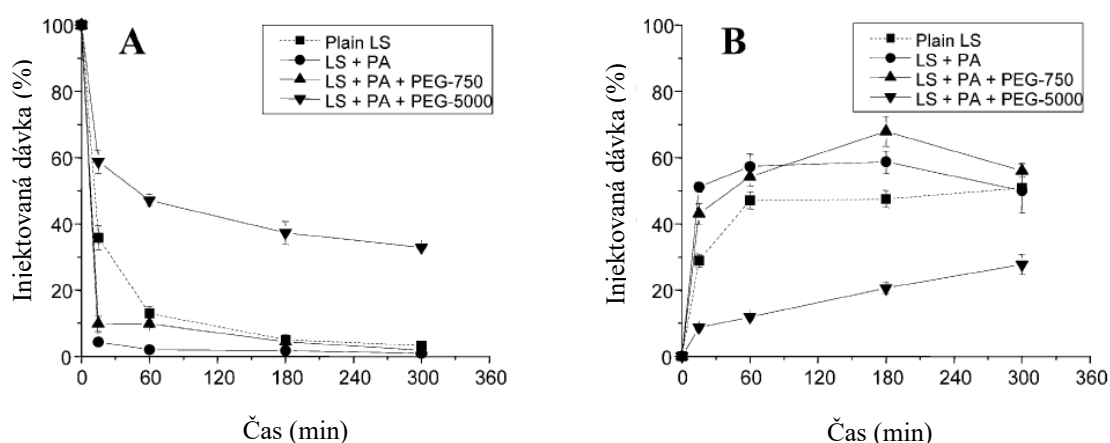
Miller C. a spol. se zabývali souvislostí mezi povrchovým nábojem liposomů a endocytózou na dvou buněčných liniích – buněčná linie lidského karcinomu vaječníků (HeLa) a buněčnou linií mononukleárních makrofágů (J774). Byly připraveny velké unilamelární liposomy (LUV) z fosfatidylcholinu (DOPC) s/bez přídavku kladně nabitého 1,2-dioleoyl-3-dimethylamoniumpropandiolu (DODAP) nebo záporně nabitého 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfatidylserinu (DOPS). U některých liposomů byl přídavek 5 mol. % PEG–PE. Liposomy byly připraveny pomocí rehydratace fosfolipidového filmu a následovala úprava velikostí pomocí sonifikace a polykarbonového filtru. Bylo zjištěno, že u HeLa buněk dochází k vyšší endocytóze u kladně nabitých liposomů ve srovnání se zápornými nebo neutrálními liposomy (Obr. 18). Tato přednost nebyla specifická pouze pro lipidy, při náhradě kladně nabitého lipidu (DOPAP) za kladné cyaninové barvivo (DiIC18) docházelo k podobnému rozsahu endocytózy jako u DOPAP. Při pozorování endocytózy u nabitých liposomů s přídavkem polyethylenglykolu u buněčné linie HeLa bylo zjištěno, že endocytóze podléhají daleko více kladně nabitě liposomy než záporně nabitě liposomy. U buněčné linie J774 byla dokázána vyšší interakce u kladně nabitých liposomů než u záporně nabitých. To by mohlo být vysvětleno povrchovými receptory, které zajišťují rozpoznávání látek a následnou adhezi u makrofágů. Při celkovém srovnání míry endocytózy u stealth liposomů a nabitých liposomů bylo potvrzeno, že rozsah endocytózy u stealth liposomů (i nabitých) je nižší než u liposomů bez PEG [52].



Obr. 18: Účinek náboje liposomu na endocytózu pomocí buněčné linie HeLa [52]

Smistad G. a kol. se zabývali toxicitou liposomů zkoumanou in vitro na lidských buňkách (TR146) pomocí statistické experimentální konstrukce a multivariačního hodnocení. Faktory zkoumané na toxicitu byly typ hlavního fosfolipidu (vaječný PC, DMPC, DPPC), koncentrace lipidů, typ náboje, velikost liposomů, množství a povaha nabitě složky (diacyl-PA, diacyl-PG, diacyl-PS, stearylamin (SA), diactyl-TAP) v liposomech. Liposomy byly připraveny rehydratací fosfolipidového filmu. V této studii bylo potvrzeno, že kladně nabitě liposomy jsou toxické pro buňky TR146, přičemž SA vykazuje vyšší toxicitu než diacyl-TAP. Při formulaci liposomů s kladně nabitými lipidy je nutné mít nízkou koncentraci kladné komponenty (do 20 mol. %) aby vzniklé liposomy nebyly toxické. U všech záporně nabitých liposomů byla toxicita na buňkách TR146 relativně nízká. Dále bylo zjištěno, že množství záporně nabitě složky, velikost liposomů a celková koncentrace lipidů neovlivnila toxicitu buněk TR146 při experiment [53].

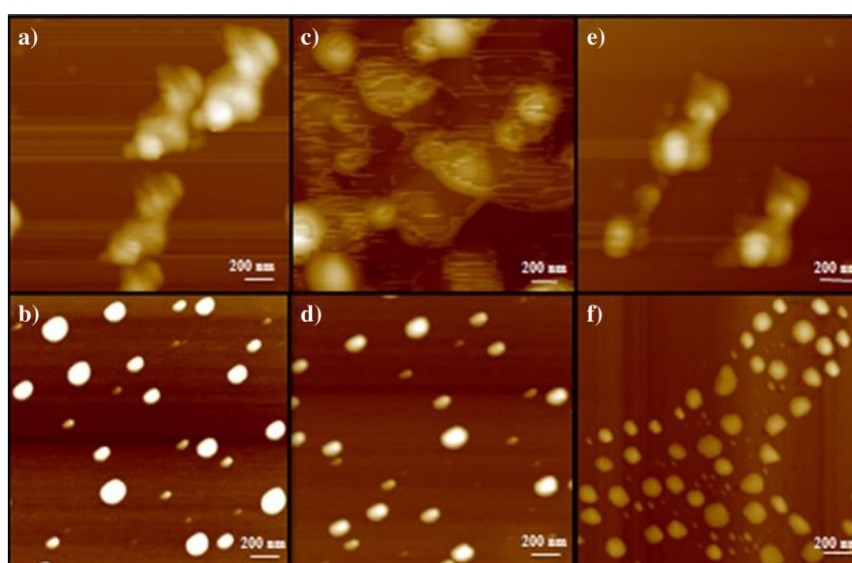
Levchenko T. a kol. se zaměřili na srovnání biodistribuce liposomů s různými povrchovými vlastnostmi. K přípravě liposomů byl v základu využit fosfatidylcholin a cholesterol. Pro modifikaci jejich vlastností byl využit 6 mol. % přídavek nabitěho lipidu (kladně nabitě stearylamin a záporně nabitě fosfatidylserin a kyselina fosfatidová) a/nebo 6 mol % polyethylenglykolu (PEG-PE) o relativních molekulových hmotnostech 750 a 5000. Pomocí DLS byla určena velikost částic i zeta potenciál. Při in vitro testech přídavek PEG byl dostatečný pro neutralizaci náboje všech typů nabitých komponent. Při in vivo testech se ukázalo, že chemický původ nabitě komponenty hraje významnou roli. U kladně nabitých liposomů (přídavek stearylaminu) docházelo k snížení „clearance“ pomocí PEG u obou molekulových hmotností. Pouze PEG o relativní molekulové hmotnosti 5 000 snížil „clearance“ u liposomů s kyselinou fosfatidovou na úroveň stealth liposomů bez nabitě komponenty (Obr. 19). U fosfatidylserinu nedokázal ani jeden z PEG snížit „clearance“ nabitých liposomů. Možným vysvětlením tohoto jevu je to, že různé opsoniny mají různé molekulové hmotnosti a jsou tedy schopné procházet přes některé PEG o určité molekulové hmotnosti [37].



Obr. 19: Efekt PEG u liposomů s obsahem PA na dobu cirkulace (A) a na akumulaci v játrech (B) pro liposomy obsahující kyselinu fosfatidovou [37]

Důležitou komponentou liposomů je cholesterol, nicméně množství použité k dosažení vhodné formulace dosud nebylo objasněno. Tohoto úkolu se zhostili **Briuqlia ML a spol.** a provedli studii, jejímž hlavním cílem bylo zjistit nejvhodnější množství cholesterolu

v liposomálních systémech, aby bylo možné připravovat stabilní a kontrolované vezikuly pro uvolňování léčiv. Pro přípravu liposomů byly použity následující fosfolipidy DMPC, DPPC a DSPC, které se kombinovaly v různých molárních poměrech s cholesterolem (např. 100, 80–20, 70–30, 60–40 a 50–50 mol. %). Stabilitní studie byly prováděny při 37 a 50 °C po dobu 30 dnů. Analýza byla provedena pomocí mikroskopie atomárních sil (viz Obr. 20), dynamického rozptylu světla a infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací. Ze stabilitní studie byly vybrány pouze dvě nejstabilnější formulace, ty byly následně podrobeny in vitro testování na uvolňování enkapsulovaného léčiva (atenolol a chinin). Pro zjištění množství uvolnění léčiv byl využit simulační systém podrobený validaci kvůli získání spolehlivých dat. Nejstabilnější formulaci liposomů získáme použitím poměru 70–30 mol. % (v literatuře známo jako poměr 2:1). Při tomto poměru je zaručené řízené a reprodukovatelné uvolňování pro léčiva s různými fyzikálně chemickými vlastnostmi a farmaceutickými aplikacemi [54].

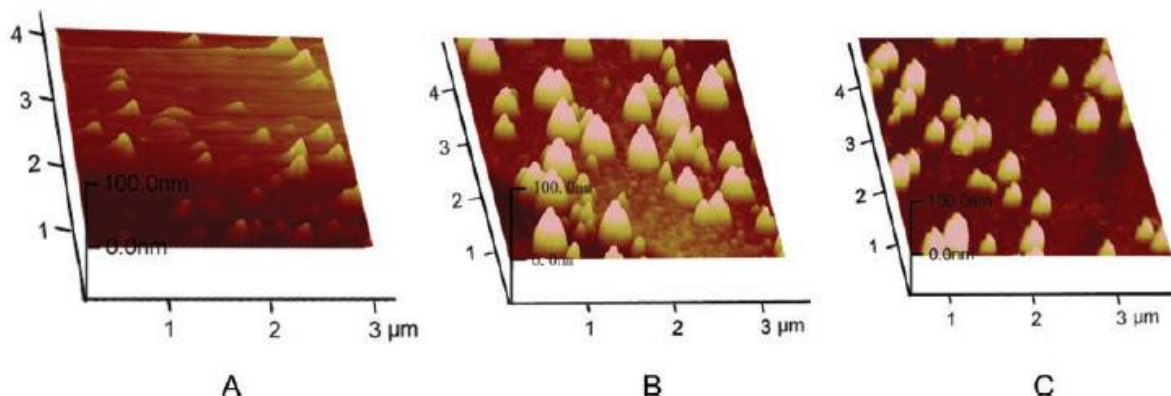


Obr. 20: Výstup z mikroskopie atomárních sil: a) DMPC, b) DMPC–cholesterol (70–30), c) DPPC, d) DPPC–cholesterol (70–30), e) DSPC a f) DSPC–cholesterol (70–30) [54]

3.2 Příprava a složení liposomů v kombinaci s trimethylchitosanem

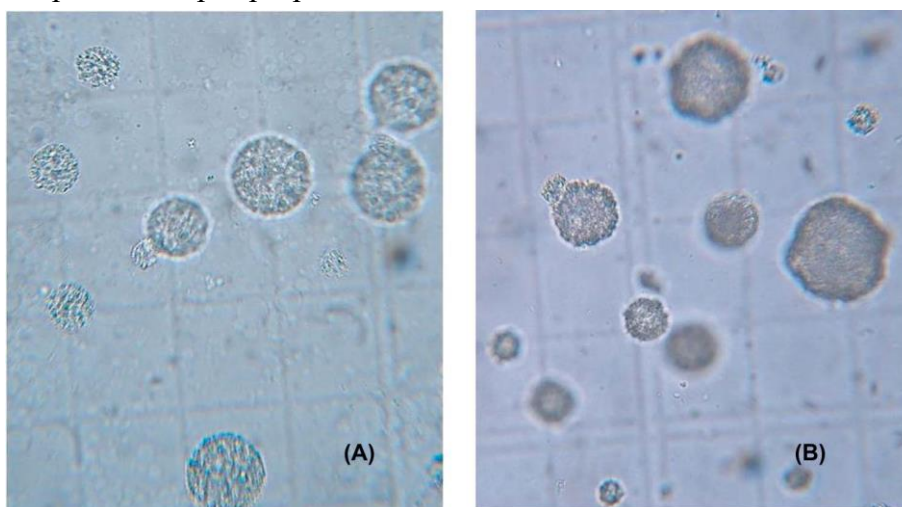
Huang A. a kol. se zabývali možnostmi, jak dopravit do těla nově vznikající účinná peptidová a proteinová léčiva. Pro dopravu tohoto druhu léčiv do organismu zvolili orální cestu a jako systém využili liposomy pokryté trimethylchitosanem. Liposomy byly připraveny pomocí rehydratace fosfolipidového filmu z fosfatidylcholinu, dicetylfosfátu a cholesterolu v poměru 8:2:1. Pro obalení liposomů trimethylchitosanem bylo smícháno stejné množství liposomů a TMC. Tento roztok byl následně vortexován a inkubován 30 minut při teplotě 10 °C. K ověření, zda došlo k navázání TMC na záporně nabitě liposomy posloužil dynamický rozptyl světla, který určil změnu velikosti o 100 nm při navázání TMC oproti samotným liposomům. Též došlo k posunu zeta potenciálu ze záporných hodnot do kladných. Morfologie liposomů byla pozorována pomocí mikroskopie atomárních sil (viz Obr. 21), získaná velikost byla v dobré shodě s výsledky z DLS. V této studii zkoušeli porovnávat mukoadhezivní vlastnosti chitosanu a trimethylchitosanu. Bylo potvrzeno, že TMC má srovnatelné mukoadhezivní vlastnosti jako chitosan. Velká výhoda TMC je v tom,

že interakce polymer–mucin v případě TMC může probíhat jak v kyselém, tak v neutrálním prostředí. Chitosan této interakce je schopný pouze v kyselém prostředí. U nově vzniklého systému byla hodnocena mukoadheze i in vivo pomocí konfokální laserové mikroskopie. Výsledky ukázaly, že liposomy s TMC jsou schopné prodloužit čas pobytu a penetrační účinek oproti samotným liposomům [1].



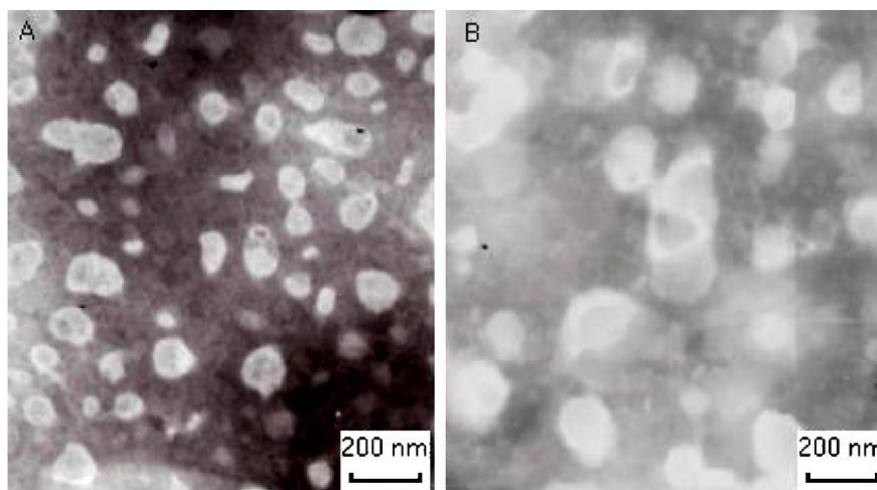
Obr. 21: Výstup z mikroskopie atomárních sil, kdy A představuje samotné liposomy, B liposomy obalené chitosanem a C liposomy obalené TMC [1]

Cao J. a spol. se snažili vymyslet systém pro zlepšení absorpce při orálním podávání modelového léčiva Oxymatrinu (přírodní alkaloid používající se při léčbě Hepatitidy typu B). Byli připraveny liposomy (multivezikulární) potažené trimethylchitosanem. Liposomy byly připraveny metodou dvojité emulzifikace z fosfatidylcholinu a fosfatidylserinu. Pro vytvoření systému TMC–liposom byl po kapkách přidáván roztok TMC do míchajícího se roztoku liposomů v poměru 1:2. Tento roztok byl poté inkubován po dobu 30 minut při 10 °C. Morfologie a obalenost MLV liposomů byla kontrolována světelným mikroskopem (viz Obr. 22). Velikost částic a distribuce byla analyzována pomocí DLS (určení velikosti a zeta potenciálu). Bylo zjištěno, že TMC je schopný zvýšit stabilitu MLV liposomů v kyselém prostředí. Z farmakologických testů bylo zjištěno, že systém TMC–liposom zvyšuje efektivní koncentraci modelového léčiva Oxymatrinu a tedy tento systém by mohl být přínosem pro zlepšení absorpce při podávání léčiv orální cestou [2].



Obr. 22: Fotka ze světelného mikroskopu neobalených MLV liposomů (A) a MLV liposomů obalených TMC (B) [2]

Zhang J. a Wang S. se snažili využít liposomy (z fosfatidylcholinu a cholesterolu) naplněné koenzymem Q10 a obalené trimethylchitosanem pro topické použití u prekorneální retence a šedého zákalu. Liposomy byly připraveny pomocí injekčního vstříkávání. Roztoky TMC (0,1; 0,2; 0,5 a 1 %) byly po kapkách přidávány do roztoku liposomů do poměru obou komponent 1:1. Ověření vzniku liposomů obalených TMC bylo pomocí DLS (velikost a zeta potenciál) a transmisního elektronového mikroskopu (viz *Obr. 23*). Test Draize a histologická analýza prokázaly vynikající oční toleranci trimethylchitosanu při topickém použití. Pomocí gama scintigrafie bylo zjištěno, že eliminace systému liposom–TMC s léčivem je podstatně pomalejší než radioaktivně značený roztok použitý jako kontrola (^{99m}Tc). To může být vysvětleno vznikem elektrostatických sil mezi TMC a povrchem rohovky. Koenzym Q10 vykazoval výborné účinky proti šedému zákalu. Docházelo ke zpoždění neprůhlednosti čočky oproti kontrolním skupinám. Koenzym Q10 zde působil jako antioxidant tlumící oxidační stres při šedém zákalu vyvolaný selenidem [3].



Obr. 23: Fotka z transmisního elektronového mikroskopu samotných liposomů (A) a liposomů obalených TMC (B) [3]

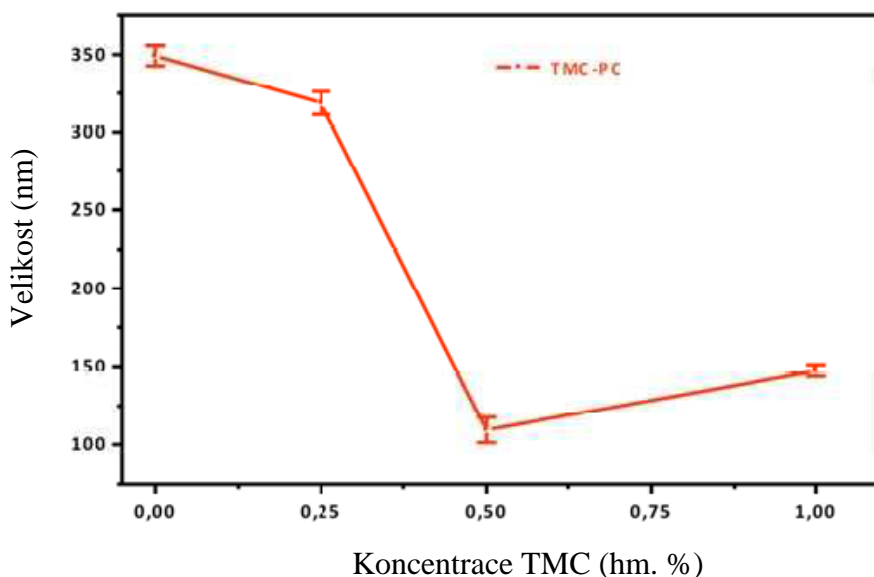
Khameneh B. a spol. se zabývali přípravou liposomů, které jsou obaleny trimethylchitosanem a hodnotili jejich mukoadhezivitu. Důvod pro přípravu tohoto systému byla možnost využití nasálního podávání antigenů a zmírnění imunitní odpovědi. Byly připraveny aniontové liposomy, které obsahovaly fosfatidylcholin jako neutrální fosfolipid, dicetylfosfát (záporná složka) a cholesterol v poměru 7:1:7. Připravené liposomy pomocí metody dehydratace a následné rehydratace fosfolipidů pomocí PBS měly průměrnou velikost 100 nm. Ty byly následně pokryty 0,1 % vodným roztokem trimethylchitosanu s 50 ± 10 % kvarternizací. Roztok TMC byl připraven v destilované vodě a liposomy byly přidávány do míchaného roztoku TMC (10 °C) po kapkách v celkovém poměru 1:4. Velikost a zeta potenciál byl určen pomocí DLS. Rychlost nosní „clearance“ a mukoadhezivní vlastnosti byly zkoumány pomocí metody gama scintigrafie za použití liposomů značených ^{99m}Tc . Velikost liposomů bez TMC a liposomů obalených TMC se lišila o dvojnásobek. Potvrzujícím faktem toho, že došlo k pokrytí liposomů trimethylchitosanem, bylo kromě změny velikosti i přesun zeta potenciálu ze záporných do kladných hodnot. Mukoadhezivní vlastnosti závisí na velikosti i na náboji inhalovaných částic. Liposomy nepotažené trimethylchitosanem vykazovaly velmi dobré mukoadhezivní vlastnosti právě díky svojí velikosti, ač byly záporné

nabité stejně jako fosfátové skupiny u kyseliny sialové, která se nachází v mucinu. Liposomy pokryté TMC i přes svoji velikost vykazovaly velmi dobré mukoadhezivní vlastnosti právě díky TMC a jeho kladnému náboji [4]. Tab. 3 slouží pro lepší orientaci změn velikostí a zeta potenciálů u připravených komplexů liposom–TMC výzkumnými skupinami.

Tab. 3: Souhrn velikostí a zeta potenciálů připravovaných liposomů a liposomálních komplexů s TMC z výše uvedených článků [1; 3; 4]

c TMC [%]	Poměr	Velikost [nm]		Zeta potenciál [mV]	
		Bez TMC	S TMC	Bez TMC	S TMC
0,1	1:1	136	193,1	–8,7	22,2
0,1	1:4	153 ± 8	376 ± 79	–40,1 ± 2,5	34,1 ± 6,6
0,5	1:1	171,9	262,9	–57,2 ± 2,4	35,8 ± 1,2
0,5	1:1	136	217,1	–8,7	22,2
1	1:1	136	331,6	–8,7	24,1

Bouropoulos N. a spol. se zabývali přípravou a charakterizací LUV liposomů z fosfatidylcholinu pokrytých TMC, kdy hlavním cílem bylo zjistit vliv koncentrace polymeru na přípravu. Liposomy byly charakterizovány pomocí DLS (velikost, zeta potenciál), diferenciální skenovací kalorimetrie a měření konstantní úhlové rychlosti. Liposomy byly připraveny pomocí rehydratace fosfolipidového filmu, kdy do roztoků, kterým byl film dehydratován, byly přidány různé koncentrace TMC (0; 0,25; 0,50; a 1 %). Roztok byl sonifikován po dobu 20 minut při kontrolované teplotě 20 °C. LUV byly protlačeny skrz polykarbonátovou membránu s velikostí pórů 0,4 µm. Velikost liposomů pokrytých TMC se snižovala se zvyšující koncentrací roztoku TMC (viz Obr. 24). Při změně koncentrace TMC docházelo k ovlivnění teploty fázového přechodu lipidů. To může být vysvětleno tím, že TMC pronikl do fosfolipidové dvojvrstvy. Zeta potenciál se zvyšoval v závislosti na množství přidaného TMC, což značí inkorporaci polyelektrolytu do liposomů. Na lokalizaci polyelektrolytů v liposomu má vliv délka řetězce mastných kyselin nacházejících se v liposomech ve vezikule [5].



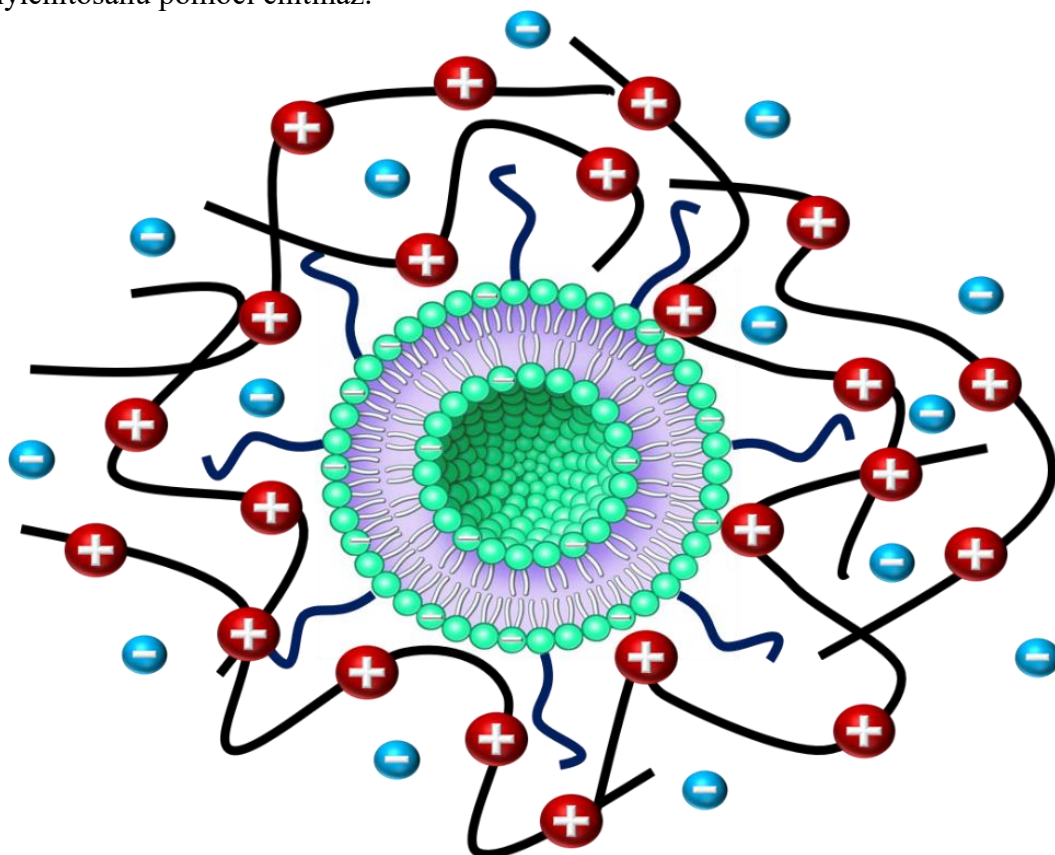
Obr. 24: Závislost velikosti částic na koncentraci TMC [5]

3.3 Popis systému pro distribuci léčiv

Mezi cíle této diplomové práce patří vybrat na základě rešerše vhodný vezikulární systém pro interakci s trimethylchitosanem, přičemž výsledný systém by měl být vhodný pro inhalační podávání. Právě kombinací trimethylchitosanu a stealth liposomu by mohl vzniknout užitečný nosičový systém pro inhalační podávání se zaměřením na léčbu **rakoviny plic**.

Na základě rešerše bylo určeno, že liposomy budou složeny z neutrálního fosfolipidu fosfatidylcholinu (tak, aby jeho teplota mezifázového přechodu byla menší než teplota lidského těla), záporného fosfolipidu přidaného v minoritním množství pro dosažení chtěného záporného náboje (kyselina fosfatidová) a PEG navázaného na fosfatidylethanolaminu přidaného v takovém množství, aby celkový zeta potenciál stealth liposomu se pohyboval kolem hodnoty -15 mV . Při této hodnotě zeta potenciálu se liposomy, i přestože obsahují záporný fosfolipid, chovají jako stealth liposomy (dokázáno in vitro i in vivo testy) [37]. Všechny fosfolipidy, které budou formovat liposomy by měly být bez dvojných vazeb kvůli netoxicitě výsledných liposomů po vystavení gama záření (možnost sterilizace) [51]. Pokud budeme přidávat cholesterol k vezikulám z důvodu vyšší stability, tak budeme používat poměr 1:2, kdy větší část poměru patří fosfatidylcholinu [54].

Jak již bylo zmíněno v odstavci 2.2.3, tak TMC by v nosičovém systému zajistil vstup stealth liposomů do krevního řečiště přes tenkou absorpční membránu v plicích pomocí otevření těsných spojů. Těsné spoje by zůstaly otevřené, dokud by nedošlo k odbourání trimethylchitosanu pomocí chitináz.



Obr. 25: Komplexní liposomální systém pro inhalační podávání, kdy PEG je znázorněný modrou čarou a TMC je znázorněný černou čarou s červenými makrokationty a modrými protiionty

Dále krevním řečištěm by pokračovaly pouze stealth liposomy, které by měly být odolné proti rychlé eliminaci z těla díky zabránění průniku opsoninů k záporně nabitě kyselině fosfatidové v liposomu přes vrstvu PEG o vhodné relativní molekulové hmotnosti (5 000). Díky tomu by měly mít stealth liposomy dostatečný čas pro samotné zacílení do nádoru. Cílení bude zaručeno vhodnou velikostí liposomů (pod 100–150 nm) – pasivní cílení díky EPR efektu. Na *Obr. 25* můžeme vidět návrh struktury systému pro inhalační podávání.

Pomocí elektrostatických interakcí mezi makrokationty TMC a záporným nábojem liposomů, způsobeným kyselinou fosfatidovou, by mohlo dojít ke vzniku použitelného nosičového systému pro distribuci léčiv. Největší otázkou zůstává, zda vrstva PEG nebude bránit elektrostatickým interakcím, díky kterým by mělo dojít k formulaci chtěného komplexu.

To, zda dojde ke vzniku použitelného nosičového systému budeme určovat pomocí změny distribuce velikosti částic a změny zeta potenciálu. Při navázání TMC na stealth liposom by měla vzrůst velikost částic přibližně o dvojnásobek a zeta potenciál by se měl dostat z mírně záporných hodnot do kladných [4].

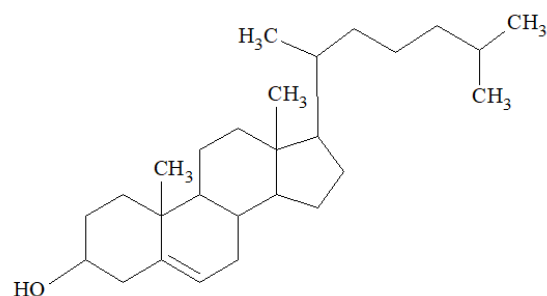
Cholesterol

Sigma Aldrich

CAS: 57-88-5

Číslo šarže: 26732-25G-F

Mr: 386,65



Polyelektrolyty	Trimethylchitonsan
	Syntetizován na FCH VUT
	Stupeň kvarternizace: 61,26 %

Rozpouštědla	Chloroform
	Penta s.r.o.
	CAS: 67-66-3
	Číslo šarže: 2107210716
	Mr: 119,38
	Methanol
	Sigma Aldrich
	CAS: 67-56-1
	Číslo šarže: 154903-2L
	Mr: 32,04
	Deionizovaná voda (ELGA)

Ostatní	Chlorid sodný
	Penta s.r.o.
	CAS: 7647-14-5
	Číslo šarže: 2106210616
	Mr: 58,44
	Chlorid draselný
	Lach-Ner, s.r.o.
	CAS: 7447-40-7
	Číslo šarže: 304120306
	Mr: 74,56
	Dihydrogenfosforečnan draselný
	Penta s.r.o.
	CAS: 7778-77-0
	Číslo šarže: 1805180516
	Mr: 136,09
	Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného
	Penta s.r.o.
	CAS: 10039-32-4
	Číslo šarže: 2105180516
	Mr: 358,14

4.2 Příprava vzorků

Na základě rešerše dané problematiky bylo zvoleno, že liposomální komplex se bude skládat z fosfatidylcholinu, přesněji z 15:0 PC, kvůli vhodné teplotě mezifázového přechodu (35 °C), která se nachází pod teplotou lidského těla i bez přídavku cholesterolu. Tento fosfolipid bude tvořit hlavní kostru liposomálního systému. Dále bude přidána kyselina fosfatidová (12:0 PC), opět s vhodnou teplotou mezifázového přechodu, která bude tvořit hlavní pilíř pro nekovalentní navázání trimethylchitosanu. Kvůli snížení „clearance“ liposomálních komplexů v lidském těle, bude přidán PEG₅₀₀₀–PE, který je schopný překrýt záporný náboj PA a omezit liposomální opsonizaci. Všechny zvolené fosfolipidy jsou bez dvojných vazeb kvůli snížení riziku jejich oxidace při sonifikaci a netoxicitě liposomů po vystavení gama záření (možnost sterilizace). Cholesterol se bude přidávat pouze v případě nutnosti zvýšení stability liposomů. Poslední složkou komplexu bude TMC, který bude zajišťovat možnost podávání stealth liposomu pomocí inhalace.

Rehydratace fosfolipidového filmu byla zvolena jako nejvhodnější a nenáročná metoda pro přípravu liposomů (na základě rešerše). Pro úpravu velikosti částic byla zvolena sonifikace.

4.2.1 Příprava PBS pufru

Na základě rešerše byl zvolen fosfátový pufr jako vhodná kapalina pro rehydrataci fosfolipidového filmu. Do čisté kádinky bylo naváženo takové množství chemikálií, aby jejich molární koncentrace odpovídala 1,37 mol·dm⁻³ NaCl, 27 mol·dm⁻³ KCl, 18 mol·dm⁻³ KH₂PO₄ a 100 mM Na₂HPO₄. Do kádinky byla přidána deionizovaná voda a za stálého míchání bylo rozpuštěno navážené množství chemikálií. Pomocí kyseliny chlorovodíkové bylo upraveno pH na 7,4. Roztok v kádince byl přelit do odměrné baňky a doplněn po rysku deionizovanou vodou.

4.2.2 Příprava koncentrační řady PC ve vodě a PBS pufru

Pro určení vhodného prostředí a optimální koncentrace fosfatidylcholinu pro vznik liposomů o určitých rozměrech byla připravena koncentrační řada v rozmezí 1·10⁻⁶ až 1·10⁻³ mol·dm⁻³ ve vodě a PBS pufru. Toto rozmezí bylo určeno na základě znalosti kritické agregační koncentrace fosfolipidů.

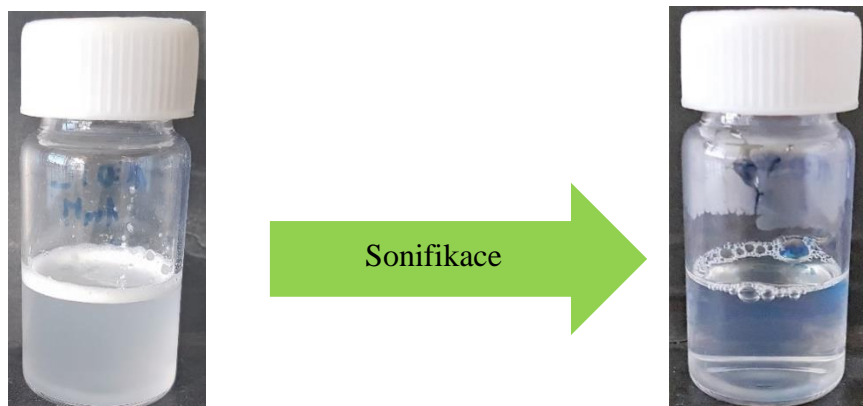
Nejdříve musely být připraveny zásobní roztoky (1·10⁻³ a 1·10⁻² mol·dm⁻³) 15:0 PC v chloroformu. Do čistých a suchých vialek bylo naváženo potřebné množství 15:0 PC a to bylo zalito 10 ml chloroformu.

Při přípravě koncentračních řad bylo do suchých a čistých vialek napipetováno určité množství jednoho ze zásobních roztoků 15:0 PC. Chloroform se nechal v digestoři volně odpařit. Fosfolipidový film byl rehydratován deionizovanou vodou nebo PBS pufrem. Takto připravené koncentrační řady byly promíchány na vortexu a následně podrobeny sonifikaci, dokud nebyly vzorky čiré nebo lehce opalescentní.

4.2.3 Ověření zvolení koncentrace PC pro přípravu liposomů

Prvně byl připraven zásobní roztok 15:0 PC v chloroformu, jak bylo popsáno výše (4.2.2) o koncentraci 0,01 mol·dm⁻³. Pro ověření vhodné koncentrace PC bylo do čisté a suché vialky napipetováno 200 µl připraveného zásobního roztoku. Po odpaření těkavého rozpouštědla byl

fosfolipidový film rehydratován 2 ml deionizované vody. Výsledná koncentrace fosfatidylcholinu ve vzorku byla $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Po přidavku vody byl vzorek promíchán na vortexu a podroben sonifikaci dokud nebyl vzorek čirý/lehce opalescentní (zpravidla 15 minut). Vizualní vliv sonifikace při přípravě liposomů můžeme vidět na *Obr. 26*.



Obr. 26: Vizualní vliv sonifikace na přípravu vzorku

4.2.4 Příprava liposomů z PC s přidavkem 6 mol. % PA

Nejdříve byl připraven zásobní roztok pro vzorky s přidavkem kyseliny fosfatidové. Bylo naváženo takové množství PA, aby ve výsledné koncentraci tvořila 6 mol. % z celkového množství fosfolipidů (určeno inspirací z článku [37]). Tato navážka byla zalita zásobním roztokem fosfatidylcholinu v chloroformu o koncentraci $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Samotný vzorek byl připraven tak, že bylo napipetováno 200 μl zásobního roztoku. Po odpaření chloroformu následovala rehydratace fosfolipidového filmu 2 ml deionizované vody. Po přidavku vody byl vzorek promíchán na vortexu a podroben sonifikaci dokud nebyl vzorek čirý (přibližně 2 až 3 hodiny).

Později byla použita jiná metoda přípravy liposomů s přidavkem PA kvůli důvodům, které jsou zmíněny ve výsledcích (5.2.1). Kyselina fosfatidová o koncentraci 6 mol. % byla rozpuštěna v methanolu a byla postupně přidávána do roztoku již vzniklých liposomů z 15:0 PC, které byly připraveny dle postupu zmíněném v kapitole 4.2.3. Roztok liposomů byl zahříván ve vodní lázni na teplotu 40°C , která je vyšší než teplota mezifázového přestupu 15:0 PC i 12:0 PA. Po 20 hodinách, kdy methanol z roztoku vytékal, byl vzorek podroben sonifikaci, dokud nedošlo k jeho vyčerení (přibližně 30 minut).

4.2.5 Příprava liposomů z PC s přidavkem 20 a 25 mol. % PA

Prvně byly připraveny zásobní roztoky pro vzorky s vyšším přidavkem 12:0 PA (20 a 25 mol. %). Vždy bylo naváženo takové množství kyseliny fosfatidové, aby ve výsledném objemu tvořila 20 nebo 25 mol. % z celkového množství fosfolipidů. Tato navážka byla zalita zásobním roztokem 15:0 PC v chloroformu o koncentraci $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Jednotlivé vzorky poté byly připraveny tak, že bylo napipetováno 200 μl zásobního roztoku a po odpaření těkavého rozpouštědla byl fosfolipidový film rehydratován 2 ml deionizované vody. Po přidavku vody byl vzorek promíchán na vortexu a podroben sonifikaci při 40°C , dokud nebyl vzorek čirý/lehce opalescentní (až 24 hodin).

4.2.6 Příprava liposomů z PC s přídavkem 30 mol. % PA

Při přípravě zásobního roztoku PC o koncentraci $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ s přídavkem 30 mol. % PA bylo do suchých a čistých vialek nejdříve naváženo potřebné množství PC. Následně k naváženému PC bylo naváženo takové množství kyseliny fosfatidové, aby ve výsledném zásobním roztoku tvořila 30 mol. % z celkového množství fosfolipidů. Tato navážka již nebyla zalita pouze chloroformem. Při přípravě zásobního roztoku s vyšším obsahem PA již nedocházelo k úplnému rozpuštění PA a navážené množství obou fosfolipidů (PC a PA) bylo rozpouštěno ve směsi chloroformu a methanolu v poměru 4:1.

Následně kvůli špatné reprodukovatelnosti vzorku s přídavkem 30 mol. % PA k PC, byl do zásobního roztoku přidán cholesterol v poměru 2:1 = PC:cholesterol (inspirace článkem [54]). Zásobní roztok s cholesterolem byl připraven tak, že navážené množství cholesterolu bylo zalito zásobním roztokem $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 15:0 PC s 30 mol. % 12:0 PA v chloroformu a methanolu (4:1).

Příprava samotných vzorků byla obdobná jako v odstavci 4.2.5, s tím rozdílem, že sonifikace probíhala v rozmezí 30–60 minut při 40°C . Délka sonifikace byla zásadně ovlivněna přítomností či nepřítomností cholesterolu.

4.2.7 Příprava stealth liposomů (z PC, 30 mol. % PA a 6 mol. % PEG–PE)

Nejdříve musel být připraven zásobní roztok, kdy do suché a čisté vialky bylo naváženo takové množství PEG₅₀₀₀–PE, aby ve výsledném objemu tvořil 6 mol. % z celkového množství fosfolipidů (inspirace článkem [37]). Tato navážka byla zalita zásobním roztokem složeného z 15:0 PC o koncentraci $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, 30 mol. % PA a cholesterolu v chloroformu a methanolu.

Samotné vzorky poté byly připraveny obdobně jako v odstavci 4.2.5, s tím rozdílem, že sonifikace probíhala 30–60 minut při 65°C . Pro zúžení distribuce liposomů, byl roztok stealth liposomů dvakrát přefiltrován přes filtr o velikosti pórů $0,2 \mu\text{m}$.

4.2.8 Kombinace stealth liposomu a trimethylchitosanu

Pro kombinaci stealth liposomů a trimethylchitosanu jsme zvolili dvě metody přípravy. V první metodě byly nejdříve připraveny samotné stealth liposomy (viz 4.2.7), které byly dvakrát přefiltrovány přes filtr o velikosti pórů $0,2 \mu\text{m}$ a byla změřena jejich velikost a zeta potenciál. Následně byl připraven zásobní roztok trimethylchitosanu o různých koncentracích (0,01; 0,05; 0,1; 0,5 a 1 %) tak, že bylo naváženo určité množství polysacharidu, které bylo zalito deionizovanou vodou. Takto připravený zásobní roztok TMC byl míchán nejméně 24 h na magnetické míchačce pro úplné rozpuštění navážky.

Do míchaného roztoku stealth liposomů (250 rpm) ve vodní lázni při teplotě 10°C byl přikapáván roztok trimethylchitosanu o různých koncentracích v různých poměrech (1:1, 1:2, 1:4), kdy větší část ve vzorku tvořil TMC. Směs byla míchána 60 minut při udržované teplotě 10°C . Následně byla proměřena distribuce velikosti částic a zeta potenciál pro potvrzení nebo vyvrácení vzniku komplexního liposomálního systému (inspirace články [1; 2; 3; 4]).

Další způsob, který jsme vyzkoušeli pro dosažení navázání trimethylchitosanu na stealth liposomy byla rehydratace fosfolipidového filmu přímo roztokem TMC (inspirace článkem [5]). Zásobní roztok pro stealth liposomy byl připraven stejně jako v odstavci 4.2.7 a jednotlivé vzorky byly připraveny stejně jako v odstavci 4.2.5 s tím rozdílem,

že pro rehydrataci fosfolipidového filmu byly využity 2 ml zásobního roztoku TMC o různých koncentracích (0,01; 0,05; 0,1; 0,5 a 1 %). Takto připravené vzorky byly promíchány na vortexu a podrobeny 40 minutám sonifikace.

4.3 Měření a zpracování výsledků

Při řešení diplomové práce se pro charakterizaci a potvrzení vzniku chtěného komplexního liposomálního systému využívalo měření distribuce velikosti částic a zeta potenciál na přístroji ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments).

Distribuci velikosti částic jsme byly schopni určit pomocí dynamického rozptylu světla. Měření probíhalo ve skleněných kyvetách při 25 °C, doba kalibrace byla nastavena na 60 vteřin. Poloha v kyvetě, při které laser snímal rozptyl částic ve vzorku, byla nastavena na fixní hodnotu 1,00. Každý vzorek byl proměřen nejméně třikrát a z těchto měření byl proveden průměr. Výsledkem byla naměřená závislost intenzity rozptýleného světla ku velikosti částic. Střední hodnota velikosti částic byla používána pro vyhodnocování. Tato hodnota byla získána z inflexního bodu korelační křivky. Pro vyhodnocení jsme si mohli dovolit používat střední velikost částic, protože ve všech vzorcích se polydisperzní index (PDI) pohyboval pod hodnotou 0,5.

Zeta potenciál byl určen pomocí metody elektroforetického rozptylu světla. Měření probíhalo při 25 °C pomocí dip cell elektrody, přičemž doba inkubace byla 10 vteřin. Zeta potenciál pro každý vzorek byl získán průměrem z pěti měření.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

V teoretické části jsme zmiňovali vhodnou velikost stealth liposomů (pod 100–150 nm), avšak v této diplomové práci jde hlavně o prokázání vazby kyseliny fosfatidové v liposomech s TMC i přes vrstvu PEG. Proto na striktní dodržování velikostí (vzhledem k distribucím) nebude brán až takový zřetel. Bude nám stačit to, aby střední velikosti částic splňovaly tyto hranice. Proto uvedené velikosti všech částic ve výsledcích jsou průměry středních velikostí částic.

V některých měřeních distribuce velikostí u liposomů můžeme pozorovat pík v oblastech okolo 6 μm . S největší pravděpodobností se jedná o prachové částice. Dalším možným vysvětlením tohoto píku je to, že při měření korelační křivky se projevil šum, díky kterému došlo ke špatnému nařizování. V každém případě u finálních stealth liposomů před kombinací s trimethylchitosanem byl používán filtr s póry o velikostech 0,2 μm a pokud se jedná o prachové částice, tak jsou pokaždé odstraněny z roztoku. Proto v rámci vyhodnocování tento pík není rozebírán.

5.1 Vhodná koncentrace 15:0 PC a vhodné prostředí

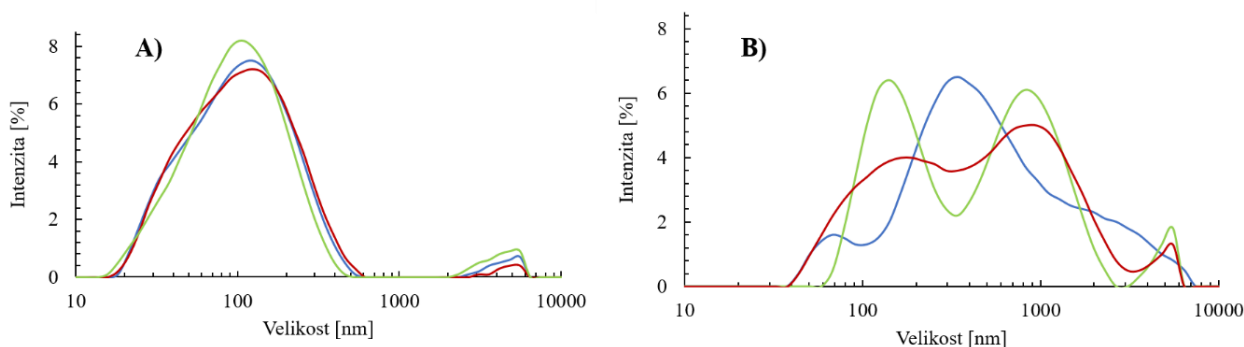
Pro přípravu samotného stealth liposomu bylo nejdříve potřeba připravit si základní kostru liposomu, skládající se z neutrálního fosfolipidu (15:0 PC), přičemž tato kostra byla dále modifikována kyselinou fosfatidovou a polyethylenglykolem.

Prvně musela být zvolena vhodná koncentrace fosfatidylcholinu a vhodné prostředí, kde dojde ke vzniku stabilního liposomu o vhodné velikosti při nízké koncentraci PC. Kvůli tomu byla zvolena koncentrační řada v rozmezí 10^{-6} až 10^{-3} $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, která se nacházela v blízkosti kritické agregační koncentrace (CAC) zvoleného fosfolipidu a byla připravena v deionizované vodě a ve fosfátovém pufru (PBS pufr).

5.1.1 Koncentrační řada 15:0 PC ve vodě

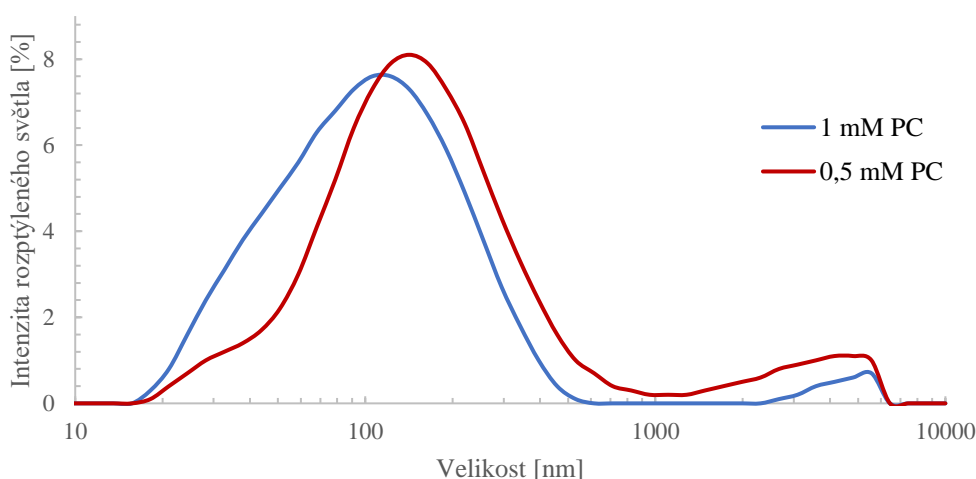
U nejnižších koncentrací (10^{-6} až $5\cdot 10^{-6}$ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ PC) se ve vzorcích nacházelo velmi malé množství částic, nedocházelo k dostatečnému rozptylu světla a nebyli jsme tedy schopni získat adekvátní výsledky. Proto tyto dvě koncentrace nejsou vhodné pro následující experimenty. Pravděpodobně se nacházíme pod CAC daného fosfolipidu.

V následujícím rozmezí koncentrací (10^{-5} až 10^{-4} $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ PC) se při měření ve vzorcích již nacházelo dostatečné množství částic pro rozptyl. Problém ovšem nastal při reprodukovatelnosti jednotlivých měření. Jednotlivá měření v této oblasti koncentrací nebyla reprodukovatelná a měla širokou distribuci v rozmezí desítek až tisíců nanometrů.



Obr. 27: Srovnání reprodukovatelnosti měření u 10^{-3} $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ PC (A) a 10^{-4} $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ PC (B)

Poslední dvě koncentrace ($5 \cdot 10^{-4}$ a 10^{-3} mol·dm⁻³ PC) se již ukázaly jako vhodní kandidáti s ohledem na reprodukovatelnost v porovnání s ostatními koncentracemi PC (viz Obr. 27). Obě koncentrace PC měly střední velikost částic v rozmezí 100–150 nm a byly tedy vhodné pro další experimenty. U koncentrace $5 \cdot 10^{-4}$ mol·dm⁻³ PC byla střední velikost liposomů určena na $(124,20 \pm 2,35)$ nm a u koncentrace 10^{-3} mol·dm⁻³ PC na $(84,26 \pm 1,58)$ nm. Jako vhodnou koncentraci jsme zvolili 10^{-3} mol·dm⁻³ PC kvůli užší distribuci vzorku (viz Obr. 28) a menší střední velikosti liposomů. Pokud by ostatní přidávané fosfolipidy měly za následek výraznější zvýšení střední velikosti částic, tak by u koncentrace $5 \cdot 10^{-4}$ mol·dm⁻³ PC po jejich přidavku nemusely vznikat liposomy ve chtěném rozmezí velikostí, které je důležité pro pasivní cílení.



Obr. 28: Srovnání distribuce velikostí částic u dvou koncentrací 15:0 PC

Při měření zeta potenciálu celé koncentrační řady 15:0 PC jsme očekávali hodnotu okolo 0 mV, protože fosfatidylcholin se řadí mezi neutrální fosfolipidy, kde dochází k vyrovnaní kladného náboje na dusíku a záporného náboje na kyslíku. Avšak při měření docházelo ke kolísání hodnoty zeta potenciálu od záporných hodnot po kladné (viz Tab. 4). Tento trend bychom si mohli vysvětlit tím, že různé koncentrace fosfatidylcholinu způsobí určité uspořádání fosfolipidů, kdy „větší slovo“ dostane buď kladný nebo záporný náboj na PC.

Tab. 4: Naměřené hodnoty zeta potenciálů pro koncentrační řadu 15:0 PC ve vodě

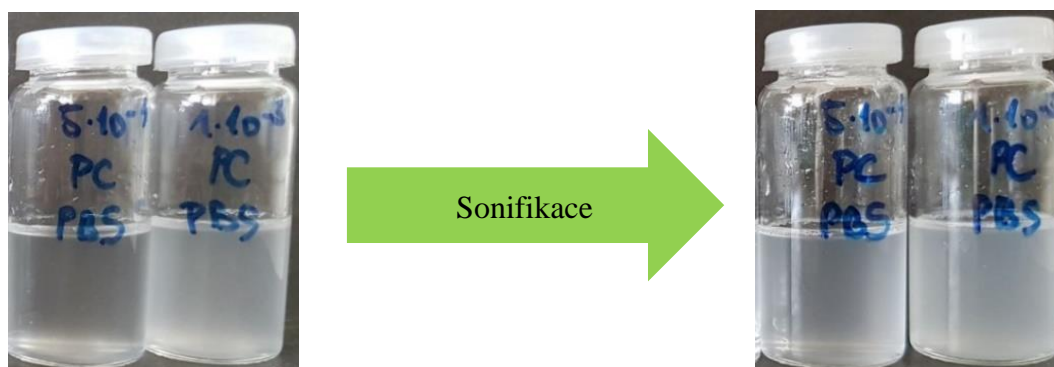
Koncentrace (M)	Zeta potenciál (mV)
$1 \cdot 10^{-5}$	$-28,50 \pm 2,47$
$5 \cdot 10^{-5}$	$-30,62 \pm 1,47$
$1 \cdot 10^{-4}$	$-18,62 \pm 2,75$
$5 \cdot 10^{-4}$	$20,80 \pm 0,64$
$1 \cdot 10^{-3}$	$27,52 \pm 1,39$

Při nižších koncentracích PC měříme záporný zeta potenciál. To by mohlo být vysvětleno tím, že liposomy nejsou tak kompaktní a projevuje se i záporný náboj na fosfátu, který se nachází více uvnitř struktury liposomu než kladný náboj, který se nachází více na povrchu liposomu. Při vyšších koncentracích fosfatidylcholinu je již liposom daleko více kompaktní a na povrchu jsme schopni zaznamenat hlavně kladný náboj na dusíku. Zeta potenciál liposomů o koncentraci 1 mmol·dm⁻³ PC byl stanoven na $(27,52 \pm 1,39)$ mV, takže můžeme říci, že vzniklé liposomy se nachází v blízkosti hranice stability.

U dvou nejvyšších koncentrací PC se nám zeta potenciál liposomů pohyboval v kladných hodnotách. Při porovnání našeho zeta potenciálu se zeta potenciálem ostatních výzkumných skupin jsme narazili na to, že v jejich případě se zeta potenciál nacházel v záporných hodnotách [55]. Myslím si, že u stabilních liposomů záporný náboj na fosfátu, který je schován poměrně hluboko ve struktuře liposomu, nemůže mít takový dosah, aby ovlivnil zeta potenciál na povrchu částic do záporných hodnot. Dle mého názoru je jejich záporný náboj na liposomech dílem pufru, který přidávali ke vzorkům při rehydrataci fosfolipidového filmu. Záporné částice pufru se mohly navázat na jinak kladný náboj liposomů a způsobit tak záporný zeta potenciál liposomů. To se v našem případě stát nemohlo, protože v superčisté vodě nemáme žádnou záporně nabitou částici, která by nám mohla měnit zeta potenciál liposomů.

5.1.2 Koncentrační řada 15:0 PC v PBS pufru

Již při přípravě koncentrační řady ve fosfátovém pufru se vyskytnul problém. U dvou nejvyšších koncentrací fosfatidylcholinu se nepodařilo získat čiré vzorky ani při sonifikaci trvající 24 hodin (viz Obr. 29). To, že vzorky byly dále zakalené svědčilo o vzniku větších a stabilních agregátů s vysokou mírou polydisperzity.



Obr. 29: Vizuální výsledek sonifikace u dvou nejvyšších koncentrací PC v PBS po 24 h

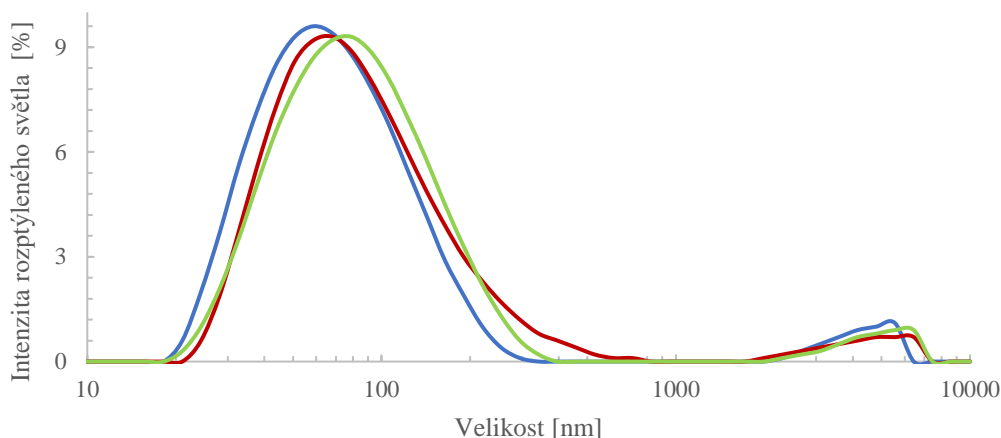
V žádné ze zvolených koncentrací fosfatidylcholinu se nám nepodařili připravit takové liposomy, které by byly reprodukovatelně měřitelné. Ve dvou nejvyšších koncentracích nám zakalenost vzorků bránila správnému stanovení distribuce velikosti částic. Navíc všechny měřitelné liposomy připravené v pufru vykazovaly nejmenší střední velikosti v okolí hodnoty 450 nm, což je velmi nevhodná velikost pro zamýšlený systém. Jeho velikost by se měla pohybovat pod rozmezím 100–150 nm.

Při měření zeta potenciálu vzniklých částic jsme narazili na další problém a to ten, že PBS pufr je příliš vodivý a nebylo možné stanovit zeta potenciál částic. To je velký problém, kvůli tomu, že nekovalentní vazbu trimethylchitosanu a stealth liposomu chceme dokazovat kromě změny velikosti částic i změnou zeta potenciálu z mírně záporných hodnot do kladných. Kvůli výše uvedeným problémům (špatná velikost a nemožnost měření zeta potenciálu) budeme dále připravovat liposomální systémy pouze v deionizované vodě.

5.1.3 Ověření správného zvolení koncentrace 15:0 PC

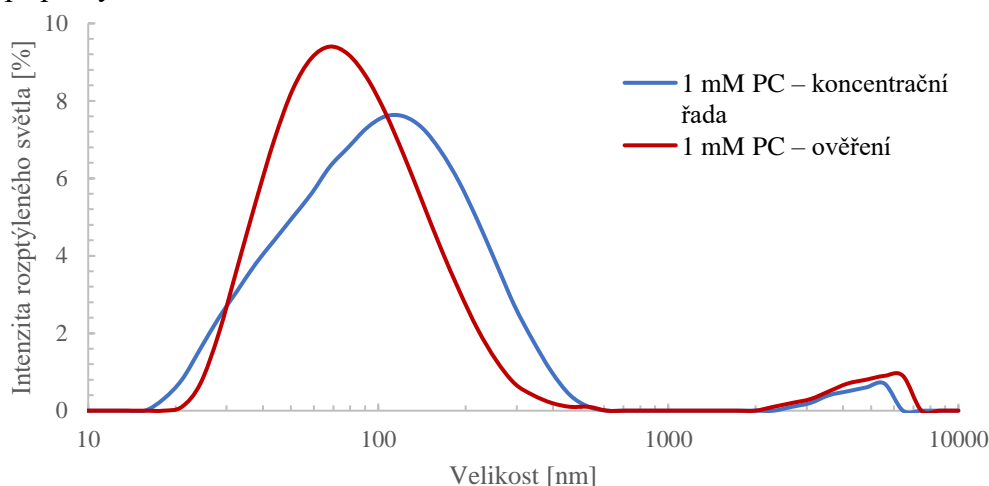
Z koncentračních řad PC v různých prostředích jsme zvolili jako nejvhodnější koncentraci 1 mM PC a jako nejvhodnější prostředí deionizovanou vodu. Správnost našeho rozhodnutí byla potvrzena nejenom dobrou reprodukovatelností měření, ale i vhodnou velikostí a úzkou

distribucí částic (viz *Obr. 30*). Střední velikost liposomů byla stanovena na $(63,58 \pm 0,87)$ nm, klesla tedy přibližně o 21 nm ve srovnání s liposomy z koncentrační řady. Skutečnost, že došlo k poklesu střední velikosti částic, můžeme vysvětlit metodou přípravy vzorků. Intenzita ultrazvuku není ve všech místech vodní lázně stejná a při přípravě koncentračních řad se vzorky nacházeli v různých místech ultrazvukové lázně. Při přípravě vzorku pro ověření správně zvolené koncentrace byl již vzorek pokaždé umístěn do místa s nejvyšší intenzitou ultrazvuku.



Obr. 30: Potvrzení dobré reprodukovatelnosti měření zvolené koncentrace $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 15:0 PC

Na základě zjištění můžeme říct, že abychom dosáhly dobré reprodukovatelnosti, musíme vzorek pokaždé umístit do stejného místa v ultrazvukové lázni, což potvrzuje i *Obr. 31*. Na tomto grafu si můžeme všimnout snížení distribuce a velikosti nově připravených liposomů oproti liposomům, které byly připravovány v různých částech ultrazvukové lázně během přípravy koncentračních řad.



Obr. 31: Porovnání velikosti liposomů o koncentraci $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ PC

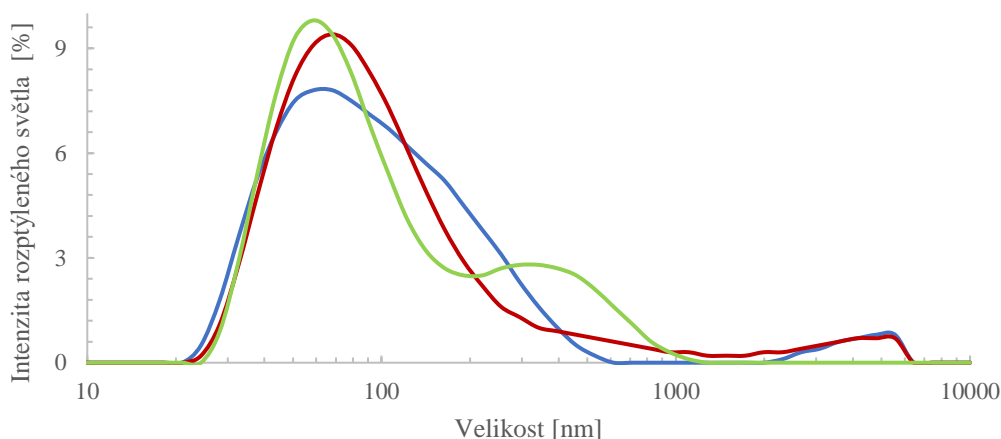
Zeta potenciál byl stanoven na $(27,60 \pm 2,75)$ mV, což je srovnatelná hodnota s nejvyšší koncentrací v koncentrační řadě PC v deionizované vodě. U všech ostatních měření, kdy byl zásobní roztok sonifikován v místě největší intenzity ultrazvuku, se zeta potenciál pohyboval vždy v okolí hodnoty 30 mV (stabilní systém s dobrou reprodukovatelností).

5.2 Vhodná koncentrace 12:0 PA

Do vhodně zvolené koncentrace 15:0 PC musela být přidána záporná složka, která nám bude tvořit hlavní pilíř pro navázání trimethylchitosanu. Tato složka musí být přidána v takové míře, aby liposom byl záporně nabitý se zeta potenciálem v rozmezí -40 až -50 mV, protože po následném přidání PEG₅₀₀₀-PE by měl být získán stealth liposom o takovém zeta potenciálu, při kterém dochází k prodloužení cirkulace liposomu v organismu i přes obsah záporně nabitých složek – potvrzeno in vitro i in vivo testy [37].

5.2.1 Přídavek 6 mol. % 12:0 PA

Jako první přídavek kyseliny fosfatidové pro přípravu záporných liposomů bylo zvoleno 6 mol. % 12:0 PA z celkového množství 15:0 PC [37]. Při rehydrataci fosfolipidového filmu a následné sonifikaci se nám podařilo připravit liposomy o střední velikosti ($79,37 \pm 0,23$) nm o zeta potenciálu ($16,22 \pm 0,79$) mV. Oproti liposomům, které se skládají čistě z PC došlo k poklesu zeta potenciálu přibližně o polovinu, ale nepodařilo se nám dostat do záporné oblasti zeta potenciálu.



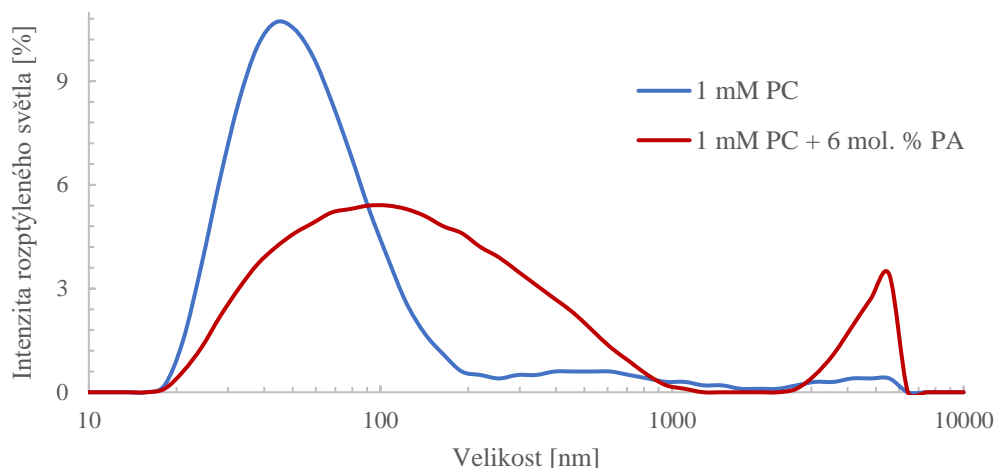
Obr. 32: Distribuce velikostí u liposomů z PC s 6 mol. % PA

Na Obr. 32 můžeme vidět distribuce velikostí připravených liposomů s přídavkem kyseliny fosfatidové, která se oproti samotnému PC zhoršila. Zhoršení distribucí můžeme teoreticky vysvětlit snížením zeta potenciálu, kdy částice byly více nestabilní a měly již daleko větší tendenci agregovat. Tyto liposomy nejsou vhodné pro chtěný systém, jediné, kde splňují požadavky pro chtěné liposomy je vhodná střední velikost částic.

Při výše zmíněné přípravě se nám záporná složka nedostane pouze do vnější vrstvy liposomu, ale i do vnitřní. Proto nás napadlo zkusit postupně přikapávat kyselinu fosfatidovou v methanolu do roztoku již hotových liposomů z PC. Methanol by měl postupně vytékat a kyselina fosfatidová se zanořit hlavně do povrchové vrstvy liposomů. Při tomto postupu nám vznikly agregáty, které měly velmi širokou distribuci velikostí oproti původnímu zásobnímu roztoku (viz Obr. 33) a zeta potenciál byl stanoven na ($12,38 \pm 2,19$) mV – pouze mírný pokles oproti předchozímu typu přípravy (o necelé 4 mV).

To, že 6 mol. % přídavek PA nestačil k vytvoření záporných liposomů, můžeme přisuzovat prostředí, ve kterém dochází k formulaci liposomů. Protože v článku, ve kterém přidávali toto množství PA k PC, měly samotné liposomy pouze z PC záporný zeta potenciál [37]. Jak jsme již zmiňovali výše, je to pravděpodobně kvůli tomu, že pro rehydrataci fosfolipidového filmu

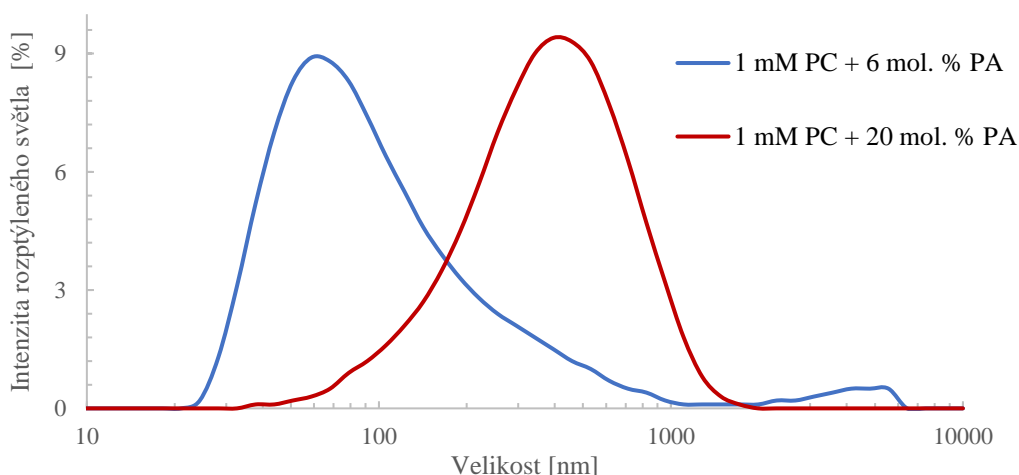
používali pufr, a ne deionizovanou vodu jako v našem případě. Protože naše samotné liposomy z PC mají kladný náboj, budeme muset zvýšit množství kyseliny fosfatidové pro vytvoření částic s chtěným záporným nábojem.



Obr. 33: Porovnání změny distribuce velikosti původního zásobního roztoku liposomů a roztoku liposomů po přidavku PA v metanole

5.2.2 Přídavek 20 a 25 mol. % 12:0 PA

Při zvýšení koncentrace kyseliny fosfatidové na 20 mol. % se nám podařilo připravit pouze velké agregáty s průměrnou hodnotou velikostí okolo 400 nm a širokou distribucí. Jak můžeme pozorovat na Obr. 34, tak v porovnání s 6 mol. % PA se nám posunula distribuce velikostí částic poměrně rapidně. Jejich výhoda oproti 6 mol. % přídavku PA byla ta, že došlo k poklesu zeta potenciálu již do záporných hodnot ($-17,30 \pm 5,40$) mV. To, že nám vznikaly pouze velké agregáty, můžeme přisoudit hodnotě zeta potenciálu, který se nachází v nestabilní oblasti a menší částice se spojují do větších útvarů.



Obr. 34: Porovnání distribuce velikostí při 6 mol. % a 20 mol. % přídavku PA k 1 mM PC

V případě, kdy došlo ke zvýšení kyseliny fosfatidové na 25 mol. % se nám ani po 24 h sonifikace nepodařilo připravit použitelné částice, vzorky byly velmi polydisperzní a zeta potenciál byl nižší než v případě 20 mol. % PA, a to ($-7,32 \pm 1,83$) mV. To si můžeme vysvětlit tím, že se nám záporná kyselina fosfatidové mohla dostat do vnitřních částí MLV

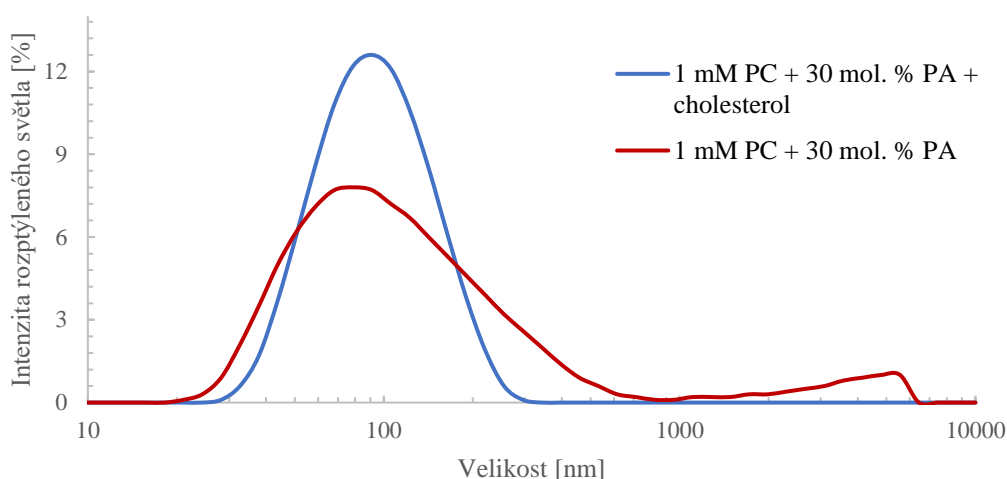
liposomů buďto během přípravy nebo během zpětné agregace nestabilních částic. Proto jsme naměřili nižší zeta potenciál i přes vyšší obsah PA v porovnání s liposomy s 20 mol. % PA.

Ani jeden z přísad kyseliny fosfatidové nás svými výsledky neuspokojil. Velikost a distribuce částic byla příliš velká a zeta potenciál nedostatečný pro vznik stabilních částic. Proto jsme zkusili zvýšit koncentraci záporné komponenty na 30 mol. %.

5.2.3 Přídavek 30 mol. % 12:0 PA a vliv cholesterolu

Při přísadku 30 mol. % kyseliny fosfatidové se nám podařilo připravit částice o střední velikosti částic ($88,32 \pm 2,45$) nm a zeta potenciálu ($-62,80 \pm 1,43$) mV. Vznikly nám velmi stabilní částice s vhodnou velikostí a s poměrně vysokým zeta potenciálem. Při snaze opětovného připravení jsme narazili na problém s reprodukovatelností. Po několik neúspěších jsme se rozhodli pro zvýšení stability přidat cholesterol v poměru k fosfatidylcholinu 1:2 [54].

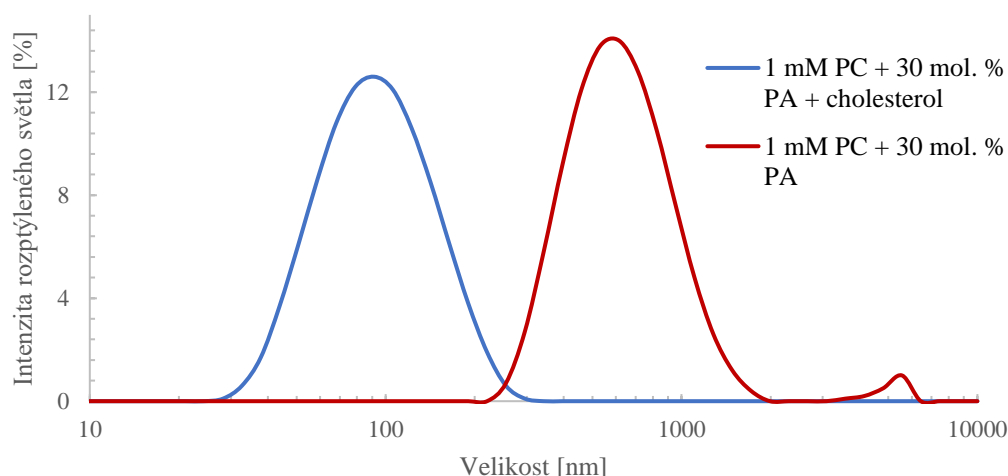
Na Obr. 35 můžeme vidět vliv cholesterolu na liposomy z fosfatidylcholinu a kyseliny fosfatidové. Po přísadku cholesterolu se nám systém stabilizoval, došlo k výraznému snížení distribuce velikosti částic. Připravené částice měly střední velikost ($82,59 \pm 2,39$) nm. Zeta potenciál se lehce snížil na hodnotu ($-45,60 \pm 7,50$) mV. I přes mírný pokles zeta potenciálu můžeme říct, že se nacházíme ve stabilní oblasti a nedochází k agregaci částic vlivem dostatečných odpudivých sil. Podařilo se nám připravit částice o chtěné velikosti a zeta potenciálu, tedy částice vhodné pro přísadek PEG₅₀₀₀–PE.



Obr. 35: Porovnání distribuce velikosti liposomů z 1 mM PC s 30 mol. % PA s/bez přísadku cholesterolu

To, že vlivem cholesterolu došlo ke stabilizaci systému, nám dokazuje i následující měření. Pokud jsme nechali systém bez cholesterolu sonifikovat stejně dlouho jako systém s cholesterolem, tak liposomy bez cholesterolu znovu vytvořili větší agregáty (zakalení vzorku) a tyto částice již nešli zpětně sonifikační rozbít. Můžeme uvažovat nad tím, že sonifikace do určité doby snižuje velikost liposomů a poté dojde ke zlomu a napomáhá zpětné aglomeraci. U liposomů s cholesterolem po stejné době sonifikace nedošlo ke zpětnému zakalení. Tento vliv můžeme pozorovat na Obr. 36, kdy bez cholesterolu nám vznikly částice o velikosti ($605,93 \pm 16,88$) nm, tedy lišící se oproti liposomům s cholesterolem přibližně o 525 nm. Navíc při proměření zeta potenciálů jsme zjistili, že částice bez cholesterolu mají zeta potenciál ($-10,10 \pm 0,37$) mV. Přestože byl stejně velký přísadek PA, tak je hodnota zeta potenciálu nižší. Pravděpodobně je to kvůli tomu,

že fosfolipidy se záporným nábojem mohou být schovány v nějaké vrstvě MLV liposomu. Tato nízká hodnota nám značí o nestabilitě systému a pravděpodobně dochází k zpětné agregaci, tedy ke vzniku větších částic.

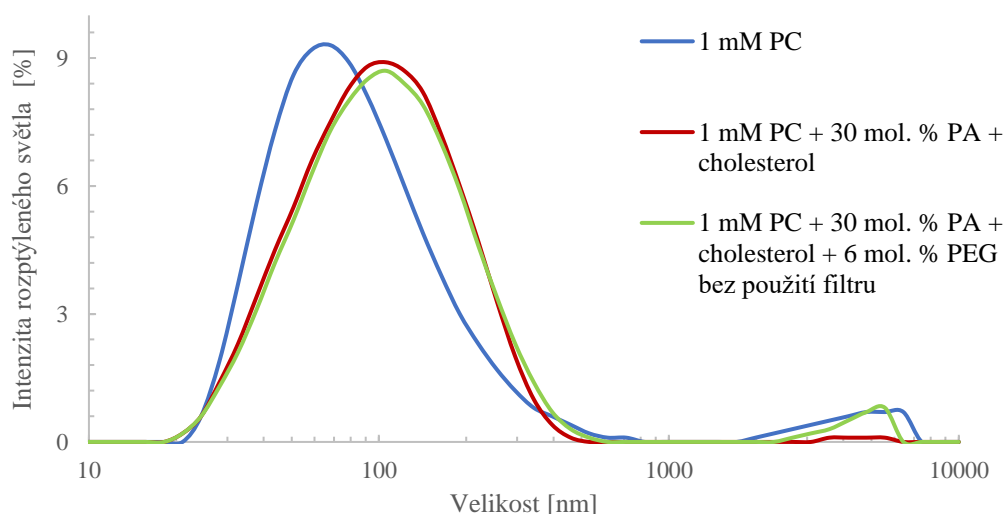


Obr. 36: Srovnání vlivu cholesterolu na stabilitu liposomu, které byly připravovány po stejnou dobu (45 minut)

5.3 Vhodná koncentrace PEG₅₀₀₀–PE

Při přidavku 30 mol. % kyseliny fosfatidové se nám podařilo připravit liposomy se zeta potenciálem ($-45,60 \pm 7,50$) mV. Při této hodnotě zeta potenciálu liposomů pouze s PA a cholesterolem bychom po přidavku 6 mol. % PEG₅₀₀₀–PE měli získat stealth liposomy se zeta potenciálem ($-15,51 \pm 0,70$) mV, které nevyvolávají při in vitro ani in vivo testech na myších imunitní reakci a u kterých je prodloužena jejich doba cirkulace (i přes obsah záporné složky) na úroveň stealth liposomu bez záporné složky [37].

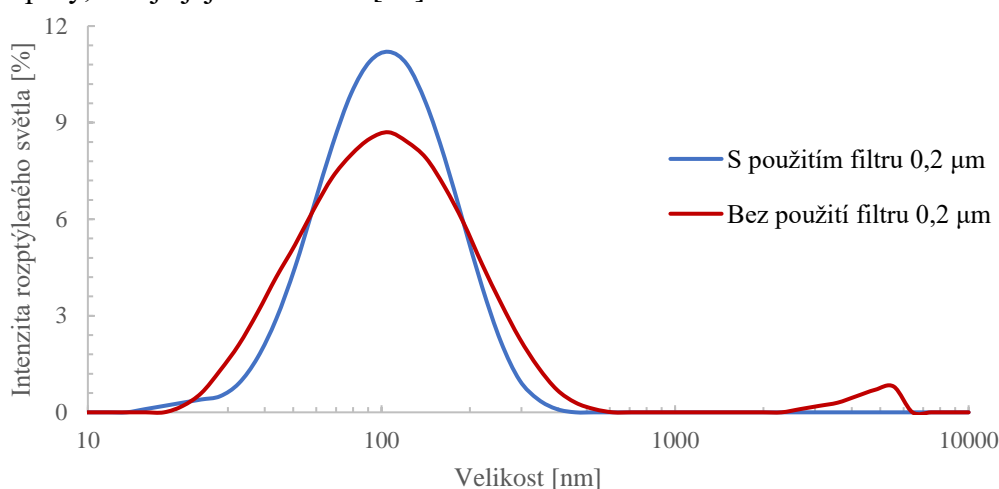
Proto jsme jako první přídavek PEG₅₀₀₀–PE zvolili 6 mol. %. Po sonifikaci se nám podařilo připravit částice se střední velikostí ($94,18 \pm 8,89$) nm, tedy částice přibližně o 6 nm větší než liposomy bez přídavku PEG – tento nárůst velikosti se shoduje s literaturou [24]. Zeta potenciál vzniklých stealth liposomů byl stanoven na ($-14,60 \pm 0,85$) mV. Když bereme v potaz odchylky měření, tak se nám podařilo připravit částice o chtěné velikosti a zeta potenciálu.



Obr. 37: Porovnání změny velikostí liposomů po přidavku jednotlivých komponent

Na Obr. 37 můžeme vidět, jak docházelo k postupné změně velikostí liposomů po přidavku jednotlivých komponent. K nejvýraznější změně velikosti došlo po přidavku záporné kyseliny fosfatidové (přibližně o 20 nm). Tento nárůst můžeme pravděpodobně přisuzovat elektrostatickému odpuzování mezi souhlasně nabitými fosfolipidy. Oproti tomu rozdíl po přidavku PEG₅₀₀₀-PE k záporným liposomům nebyl tak značný a došlo pouze k posunu střední velikosti o již zmíněných 6 nm.

Před samotnou kombinací stealth liposomů s TMC jsme se pokusili upravit jejich velikost pomocí filtru s póry o velikosti 0,2 μm (viz Obr. 38). Po jeho použití došlo ke snížení distribuce a odstranění prachových částic, ale pořád se v roztoku nacházeli i liposomy o velikostech okolo 400 nm. To si můžeme vysvětlit tím, že liposomy jsou poměrně elastické a při namáhání jsou schopné změny tvaru, a jsou tedy schopné projít i filtry s výrazně menšími póry, než je jejich velikost [56].



Obr. 38: Porovnání stealth liposomů před a po použití filtru s velikostí pórů 0,2 μm

5.4 Kombinace stealth liposomů s TMC

Pro samotnou kombinaci stealth liposomů s trimethylchitosanem jsme zvolili dvě metody přípravy. Při první metodě přípravy jsme kombinovali dva roztoky, tedy jeden roztok s již hotovými stealth liposomy a druhý roztok s danou koncentrací TMC. U druhé metody byl fosfolipidový film přímo rehydratován zásobním roztokem TMC. V obou metodách přípravy jsme použili pět různých koncentrací TMC (0,01; 0,05; 0,1; 0,5 a 1 %).

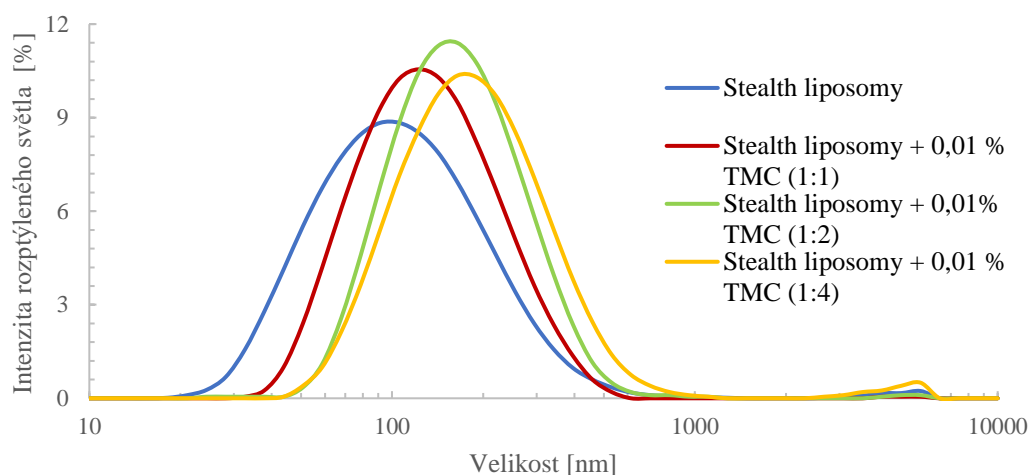
Hlavním cílem bylo pokusit se nekovalentně provázat stealth liposomy obsahující záporně nabitou kyselinu fosfatidovou s TMC i přes vrstvu PEG. Dále bylo naším záměrem zjistit nejvhodnější metodu přípravy chtěného komplexu a určit nejvhodnější koncentraci TMC.

5.4.1 Kombinace roztoku stealth liposomů s roztokem TMC

To, zda došlo ke vzniku komplexu stealth liposom–TMC jsme pozorovali posunem distribucí komplexu oproti samotným liposomům, změnou střední velikosti částic a změnou zeta potenciálu. Při přípravě komplexu jsme se rozhodli přidávat k jednomu objemovému dílu stealth liposomů různé objemové díly dané koncentrace TMC. Výsledné zvolené poměry tedy byly 1:1, 1:2 a 1:4, kdy vyšší číslo v poměru vždy náleží TMC. Tyto poměry byly zvoleny na základě literární rešerše, zejména kvůli možnému porovnání zeta potenciálů našich komplexů stealth liposom–TMC a komplexů výzkumných skupin liposom–TMC.

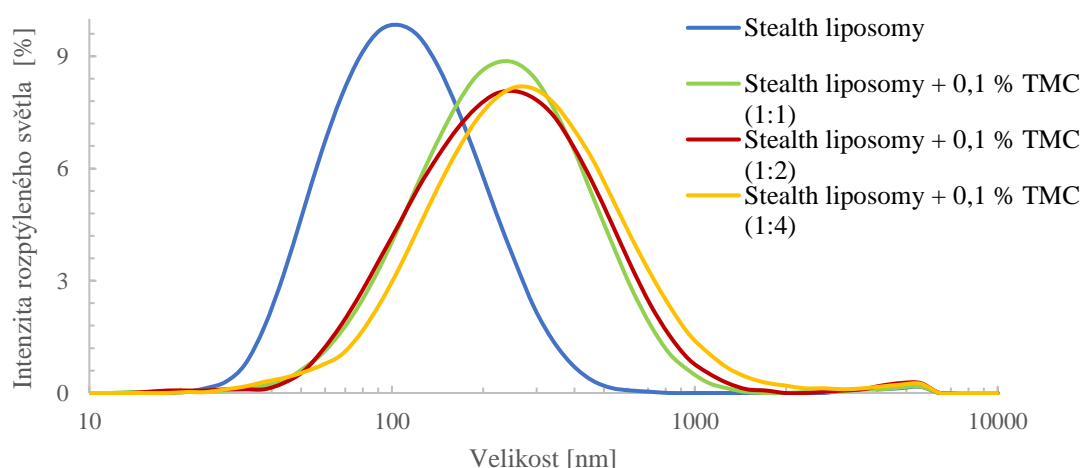
Díky tomuto porovnání jsme mohli rozhodnout, zda nám PEG narušuje nekovalentní interakci záporné kyseliny fosfatidové a TMC nebo nikoli.

První parametr, který nám mohl potvrdit nebo vyvrátit vznik chtěného komplexu ze stealth liposomů a TMC byl **posun distribucí částic**. Pokud se podíváme na nejnižší koncentraci přidaného TMC (0,01 %) na Obr. 39 můžeme vidět posun distribuce stealth liposomů po přidavku TMC. Tento posun je důkazem navázání TMC na stealth liposomy. Posun není tak výrazný a je to s největší pravděpodobností kvůli nedostatečné koncentraci přidávaného TMC.



Obr. 39: Posun distribuce stealth liposomů po přidavku 0,01 % TMC

Při zvýšení koncentrace TMC na desetinásobek (0,1 % TMC) můžeme vidět daleko výraznější posun distribuce mezi samotnými stealth liposomy a stealth liposomy po přidavku TMC (viz Obr. 40). Tento výrazný posun distribucí nám jednak potvrzuje vznik chtěného komplexu, ale také to, že tato koncentrace TMC je již dostatečná pro obalení stealth liposomů. Tento průběh změny distribucí můžeme pozorovat i u všech ostatních koncentrací přidávaného TMC (0,05; 0,5 a 1 %) – viz Přílohy.



Obr. 40: Posun distribuce stealth liposomů po přidavku 0,1 % TMC

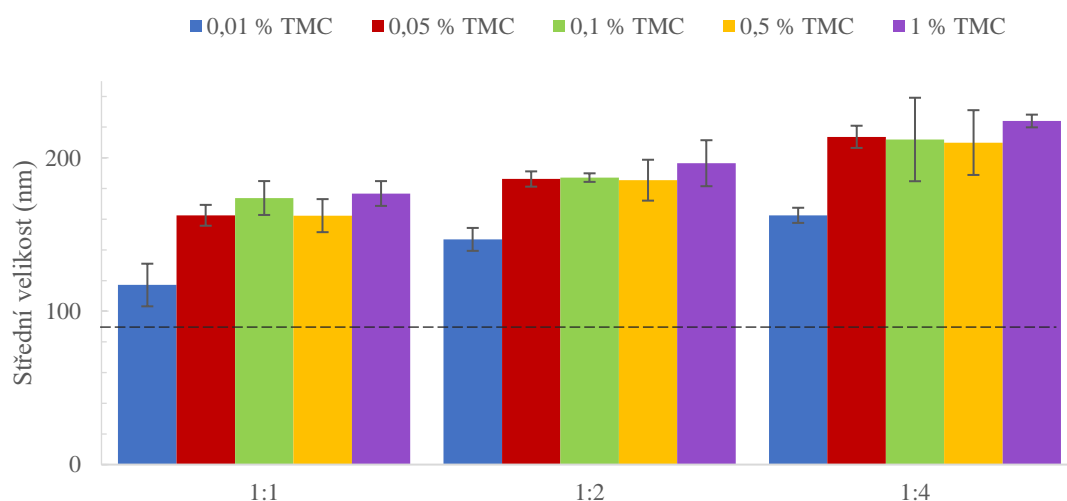
Komplexy stealth liposom–TMC, které se nacházejí na počátcích distribucí mohou být pouze částečně obaleny TMC, a proto mají poměrně malou velikost. Na nárůst velikosti

komplexu mohou mít také výrazný vliv elektrostatické repulze mezi jednotlivými makrokationty TMC, které jsou elektrostaticky vázány na stealth liposomech [57].

Na Obr. 40 můžeme také pozorovat poměrně malý posun distribucí mezi jednotlivými poměry (1:1, 1:2 a 1:4). To může znamenat, že i přes zvýšení množství TMC nedochází k výraznému zvýšení velikosti komplexu stealth liposom–TMC. Jinak řečeno může dojít k obsazení všech záporných nábojů na stealth liposomech už u prvního poměru a zbývající TMC se již vlivem elektrostatických repulzí mezi polykationty nemá šanci navázat na povrch liposomu.

Nyní se zaměříme na potvrzení vzniku systému díky **změně střední velikosti částic**. Na Obr. 41 můžeme vidět střední velikosti částic při různých použitých koncentracích a poměrech přidávaného TMC k roztoku stealth liposomů. Můžeme si všimnout, že jediná koncentrace TMC, která se výrazněji liší od ostatních je opět 0,01 %. U všech komplexů došlo ke zvýšení střední velikosti částic, u čtyř nejvyšších koncentrací až o dvojnásobek vůči původním stealth liposomům (v Obr. 41 černá přerušovaná čára). Tento dvojnásobný nárůst střední velikosti komplexu je v dobré shodě s literaturou [1; 4] a dokazuje nám navázání TMC na stealth liposomy.

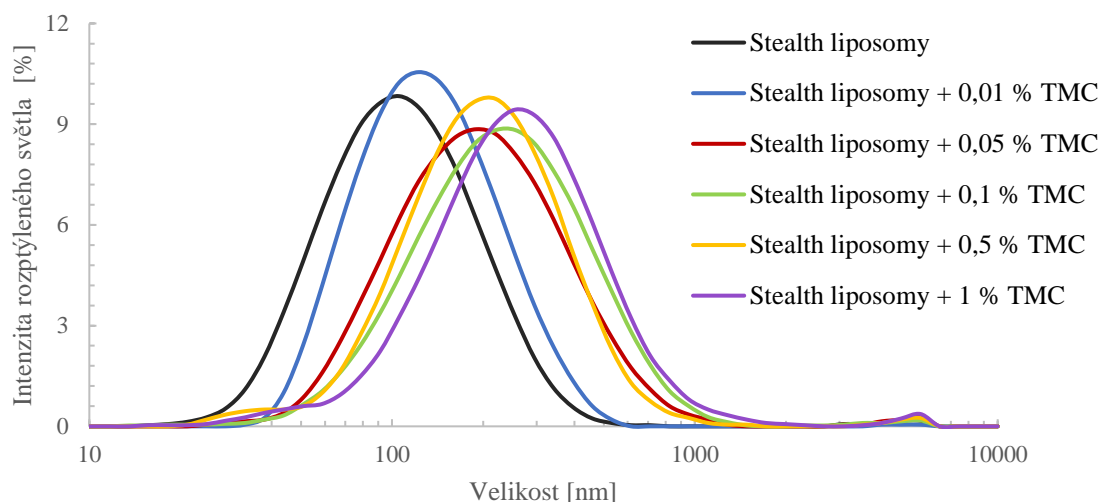
Když vezmeme v potaz směrodatné odchylky měření, tak můžeme říci, že u čtyř nejvyšších koncentrací TMC a u všech jejich poměrů máme stejně velké částice. To nás utvrzuje ve faktu, že po určitém přídavku TMC již dojde k vysycení záporných nábojů na stealth liposomu a TMC již nemá šanci se navázat na komplex díky vysoké repulzi mezi navázanými a nenavázanými polykationty.



Obr. 41: Změna střední velikosti částic po přídavku TMC o různých koncentracích v různých poměrech, kdy černá přerušovaná čára nám značí původní střední velikost stealth liposomů

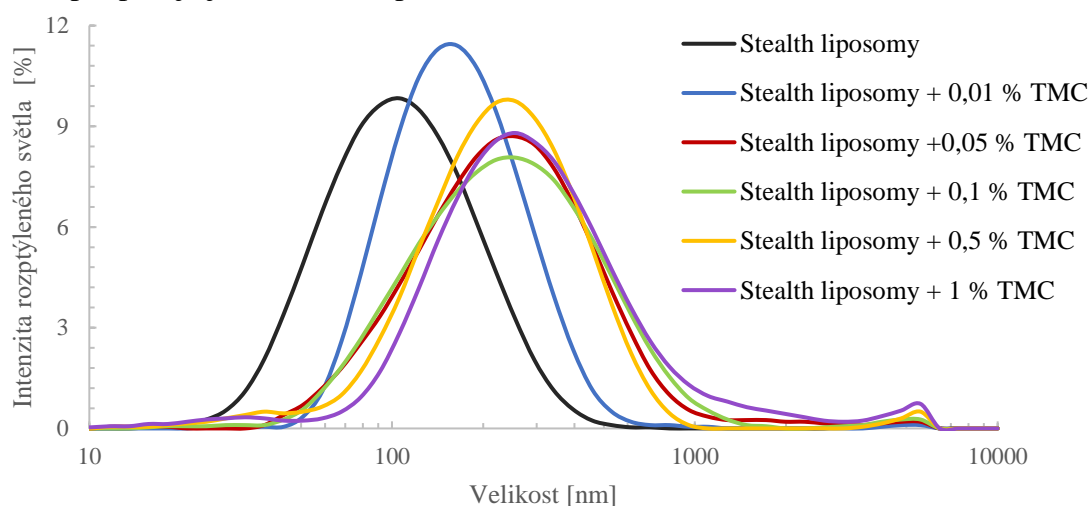
V rámci poměru 1:1 u všech koncentrací máme poměrně velké odchylky měření, které by mohly být zapříčiněny výrazným projevem elektrostatických repulzí mezi jednotlivými makrokationty vázaného TMC. Ty mohou zvyšovat průměr částic a při opakování jednotlivých měření mohou významně zkreslovat velikosti částic. Tuto úvahu podporuje i Obr. 42, kde můžeme vidět distribuce samotných stealth liposomů a distribuce komplexů, které vznikly po přídavku různých koncentrací TMC, pokaždé v poměru 1:1 k liposomům. Pouze koncentrace 0,01 % TMC je lehce mimo ostatní distribuce, za což může nedostatečná

koncentrace TMC k obalení stealth liposomů. Distribuce ostatních koncentrací TMC jsou si více méně podobné.



Obr. 42: Distribuce velikostí částic při přidavku různé koncentrace TMC v poměru k liposomům 1:1

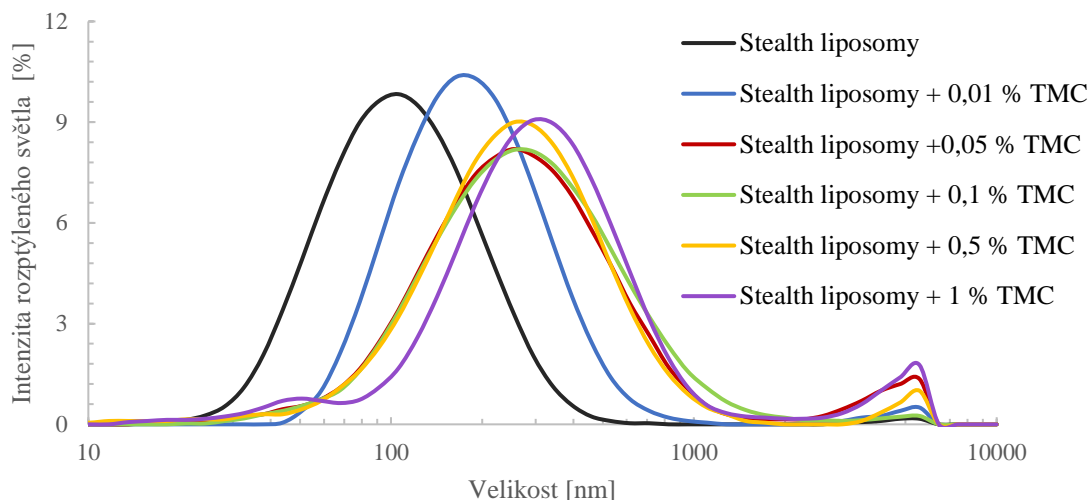
Na Obr. 43 můžeme vidět, že u poměru 1:2 nám dochází ke vzniku systému, který má skoro shodnou distribuci u všech koncentrací TMC až na 0,01 %. Při porovnání těchto distribucí se směrodatnými odchylkami u poměru 1:2 na Obr. 41, které jsou velmi malé v porovnání s ostatními poměry, můžeme říci, že při poměru 1:2 se nám tvoří nejlépe reprodukovatelné částice. Vyšší přidavek TMC nám pravděpodobně slouží ke stabilizaci systému a podporuje jeho dobrou reprodukovatelnost.



Obr. 43: Distribuce velikostí částic při přidavku různé koncentrace TMC v poměru k liposomům 1:2

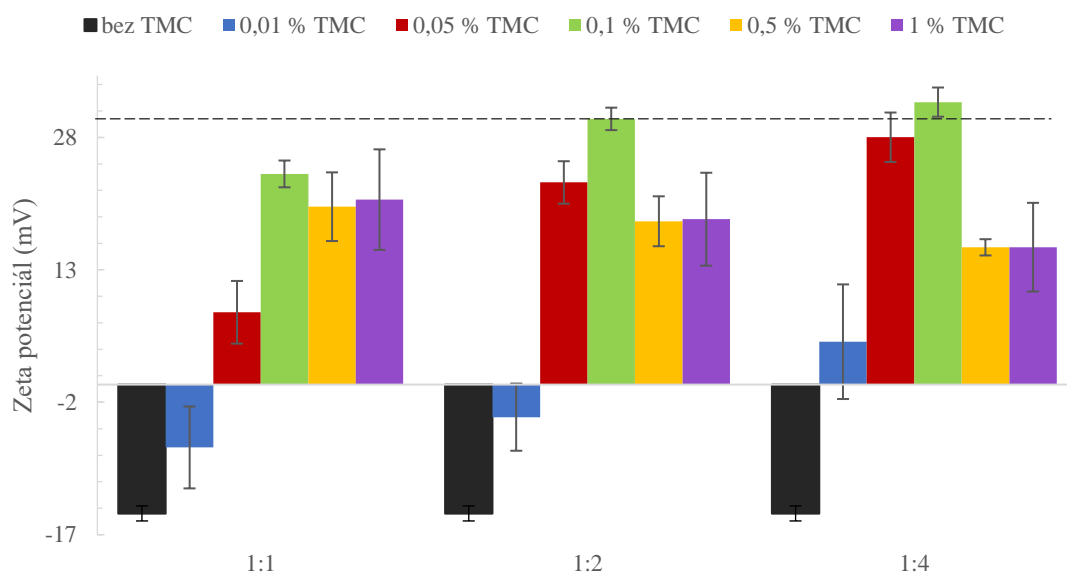
Na Obr. 44 již máme nejvyšší poměr přidavku TMC ku stealth liposomům. Distribuce nejsou v tak dobré shodě jako u poměru 1:2 i přes vyšší přidavek TMC, který by měl systémy nějakým způsobem stabilizovat a zlepšit reprodukovatelnost. S nejvyšší pravděpodobností dochází k určitému zkreslení měřených distribucí vlivem velkého množství volného TMC v okolí komplexů stealth liposom–TMC. V distribuci můžeme navíc vidět již výrazný pík v okolí hodnoty 6 μm , který by mohl částečně patřit volnému TMC. U ostatních poměrů

je tento pík poměrně nevýrazný a mohlo se tedy jednat o projev šumu při měření. Na Obr. 41 můžeme vidět poměrně velké směrodatné odchylky u poměru 1:4. Dle mého názoru za to může právě volný TMC, který nebyl ze vzorků žádným způsobem odstraněn.



Obr. 44: Distribuce velikostí částic při přidavku různé koncentrace TMC v poměru k liposomům 1:4

Poslední možností, jak jsme prokazovali vazbu TMC na stealth liposomy, bylo **změnou zeta potenciálu**. U všech koncentrací TMC došlo k posunu zeta potenciálu z původní hodnoty stealth liposomů ($-14,60 \pm 0,85$). Proto můžeme říci, že i změnou zeta potenciálu jsme dokázaly vznik komplexu stealth liposom–TMC.



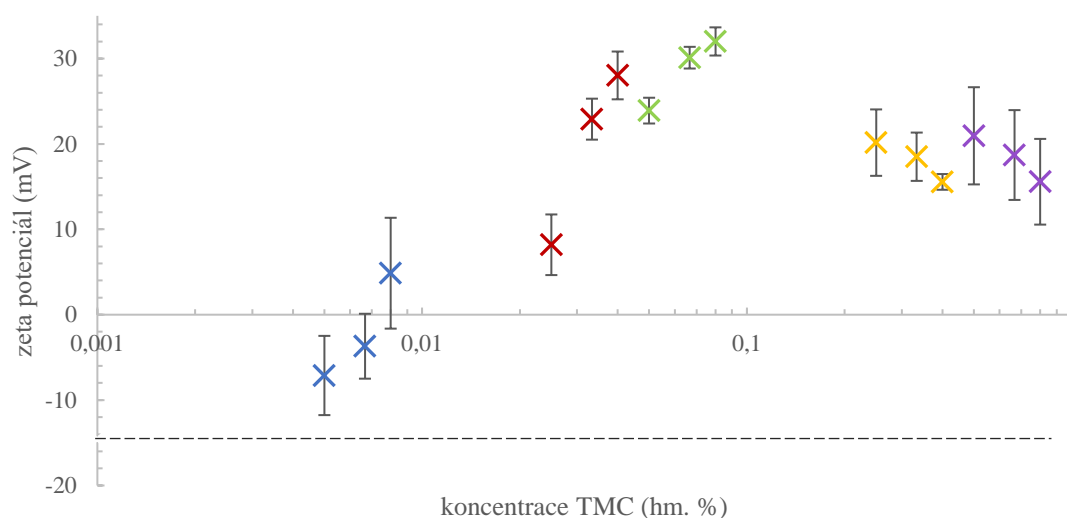
Obr. 45: Změna zeta potenciálu částic po přidavku TMC o různých koncentracích v různých poměrech, kdy černá přerušovaná čára nám značí hranici stability částic (30 mV)

Můžeme si všimnout, že koncentrace 0,01 % TMC je opravdu nedostatečná pro obalení stealth liposomů TMC, při prvních dvou poměrech máme pořád záporný zeta potenciál a u poměru 1:4 se nám zeta potenciál pohybuje v lehce kladných hodnotách s velkou směrodatnou odchylkou. U koncentrace 0,05 % TMC již při všech poměrech máme kladnou hodnotu zeta potenciálu, kdy u poměru 1:4 nám vznikají již stabilní částice, které by neměly zpětně agregovat. U koncentrace 0,1 % TMC nám u dvou nejvyšších poměrů vznikají stabilní

částice s poměrně nízkou směrodatnou odchylkou. U dvou následujících koncentrací (0,5 a 1 %) TMC došlo k poklesu zeta potenciálu oproti předchozí koncentraci TMC. Tento pokles zeta potenciálu lze pravděpodobně vysvětlit právě zvýšením koncentrace TMC. V roztoku se nám již nachází větší množství makrokationtů a tedy i protiiontů. Tyto protiionty již nemají takovou volnost pohybu a musí se nacházet v okolí svých makrokationtů a tím jim snižují kladný náboj a dochází k poklesu zeta potenciálu celého vzorku (viz 2.1.1).

I když nedocházelo při přidavku různě koncentrovaného TMC k stealth liposomům k výraznějším změnám středních velikostí komplexů, tak vidíme, že docházelo k výraznějším změnám zeta potenciálu. Vypadá to, že do určité koncentrace TMC (0,1 %) dochází ke vzniku stabilních částic vlivem vyšších přídavek TMC. Následující koncentrace TMC jsou již příliš vysoké a komplikují měření zeta potenciálu samotného komplexu.

Nyní se pokusíme interpretovat naměřené hodnoty zeta potenciálu u jednotlivých vzorků jiným způsobem. Pokud si přepočítáme koncentrace TMC vzhledem k různým poměrům v jednotlivých vzorcích zjistíme, že jsme proměřili zeta potenciály u koncentrační řady s postupně vzrůstajícím množstvím TMC. Právě tuto koncentrační řadu můžeme vidět na Obr. 46, kdy jsou od sebe barevně odděleny podle toho, z jaké původní koncentrace TMC vznikly přepočtem. Můžeme vidět postupný přechod ze záporných hodnot do kladných. Mezi body 0,0067 a 0,008 % TMC bychom se nacházeli v místě, kdy by došlo k vykompenzování kladných a záporných nábojů. Toto vykompenzování by mohlo být okem viditelné, protože by mohlo docházet např. ke vzniku sraženiny. Ta by mohla být důsledkem stabilizace.



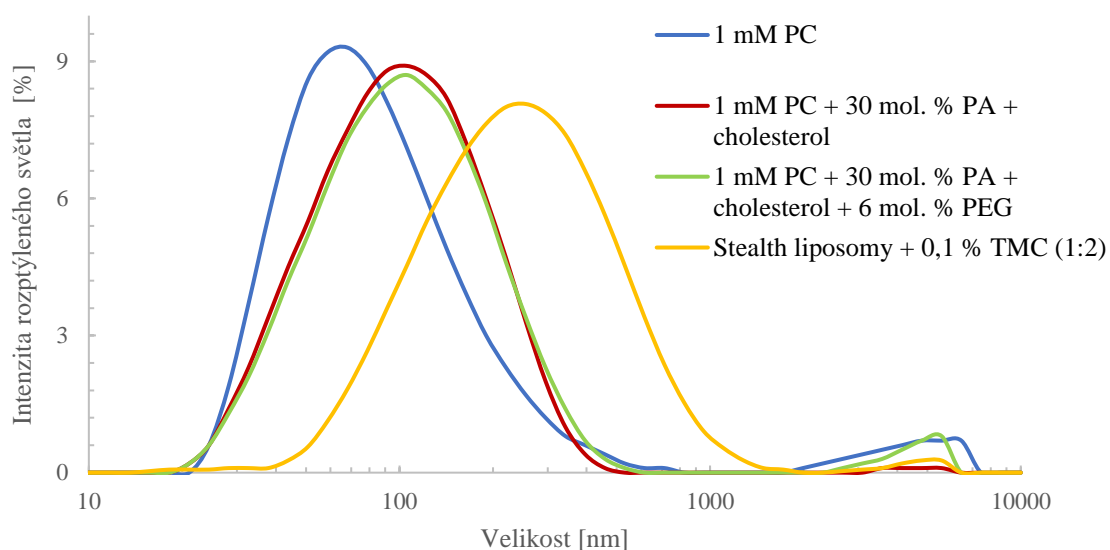
Obr. 46: Závislost koncentrace TMC na zeta potenciálu, kdy černá přerušovaná čarou odpovídá zeta potenciálu samotného stealth liposomu, modré body vznikly přepočtem z 0,01 % TMC, červené z 0,05 % TMC, zelené z 0,1 % TMC, žluté z 0,05 % a fialové z 1 % TMC

Těmito experimenty jsme dokázali, že dochází ke vzniku chtěného komplexu stealth liposom–TMC. Nyní se díky porovnání našich výsledků s výsledky ostatních výzkumných skupin pokusíme zjistit, zda PEG nějakým způsobem brání nekovalentní vazbě kyseliny fosfatidové a trimethylchitosanu.

U vzorku 0,1 % TMC v poměru 1:4 můžeme naši změnu zeta potenciálu porovnat s výsledky výzkumné skupiny Khamenech B. a spol. Tato skupina připravovala částice

bez PEG₅₀₀₀–PE se zeta potenciálem ($-40,1 \pm 2,5$) mV a velikostí (153 ± 8) nm, které kombinovala s 0,1 % TMC v poměru 1:4. Povedlo se jim připravit částice s velikostí (376 ± 79) nm a zeta potenciálem ($34,1 \pm 6,6$) mV [4]. Naše samotné liposomy bez PEG měli velmi podobnou hodnotu zeta potenciálu (přibližně -45 mV). Při srovnání zeta potenciálů obou komplexů si můžeme všimnout, že se nám podařilo i přes obsah PEG₅₀₀₀–PE dosáhnout identického zeta potenciálu liposomů obalených TMC. To nám dokazuje, že vrstva polyethylenglykolu nijak nebrání nekovalentní interakci mezi TMC a záporným liposomem. Fakt, že i přes vrstvu polyethylenglykolu se projeví celkový záporný náboj pro nekovalentní interakci nám dokazuje i další srovnání vzorku 0,1 % TMC v poměru 1:1. Tento vzorek byl připraven výzkumnou skupinou Zhang J. a spol., kdy samotný liposom měl velikost 136 nm a zeta potenciál $-8,7$ mV. Po přidavku 0,1 % TMC vznikl komplex s velikostí 193,1 nm a zeta potenciálem 4,12 mV [3]. Pokud by se v našem případě neprojevil záporný náboj přes vrstvu PEG, tak by se zeta potenciál celého komplexu pohyboval právě kolem hodnoty 5 mV, protože náš stealth liposom má zeta potenciál přibližně -15 mV. V našem případě se však zeta potenciál u vzorku s 0,1 % TMC v poměru 1:1 pohybuje okolo hodnoty 24 mV. Toto srovnání nám tedy dokazuje, že **i přes vrstvu PEG dochází k nekovalentní interakci** kyseliny fosfatidové a TMC v plném rozsahu. Tato interakce je pravděpodobně možná kvůli tomu, že elektrostatické interakce jsou nekovalentní síly dalekého dosahu.

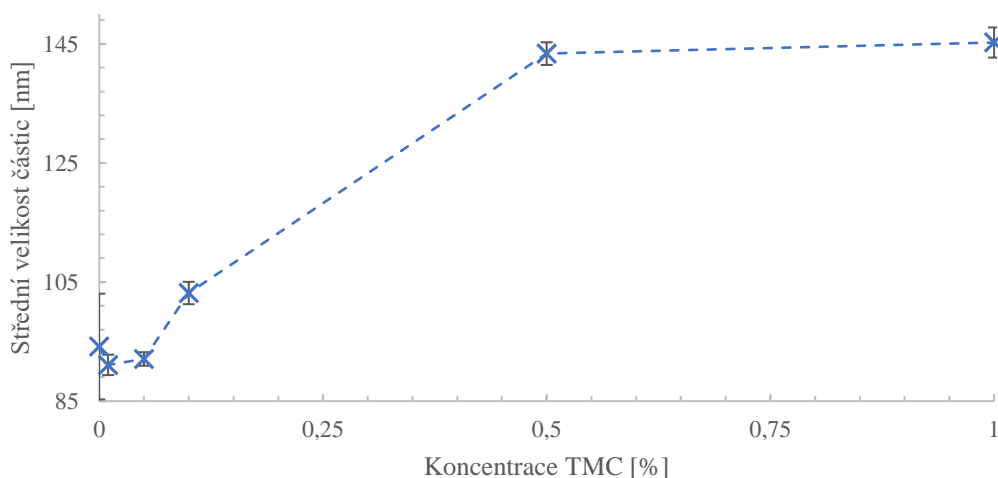
Celkově můžeme říct, že metoda, kdy do roztoku stealth liposomů postupně přidáváme TMC se ukázala jako velmi vhodná pro formulaci chtěných komplexů. Na základě změny distribucí částic, změny střední velikosti částic a změny zeta potenciálu částic můžeme říct, že u všech koncentrací TMC (0,01; 0,05; 0,1; 0,5 a 1 %) došlo ke vzniku komplexu stealth liposom–TMC. Po celkovém srovnání se nám jako nejlépe jeví koncentrace **0,1 % TMC v poměru 1:2**. Tato koncentrace byla nejlépe reprodukovatelná, tvořila stabilní částice s dostatečným zeta potenciálem – zabránění zpětné agregaci. Navíc tento kladný potenciál by mohl být dostatečný pro otevření těsných spojů v alveolech. Na *Obr. 47* můžeme vidět postupnou změnu distribuce částic po přidavcích jednotlivých komponent.



Obr. 47: Postupná změna distribuce částic po přidavcích jednotlivých komponent

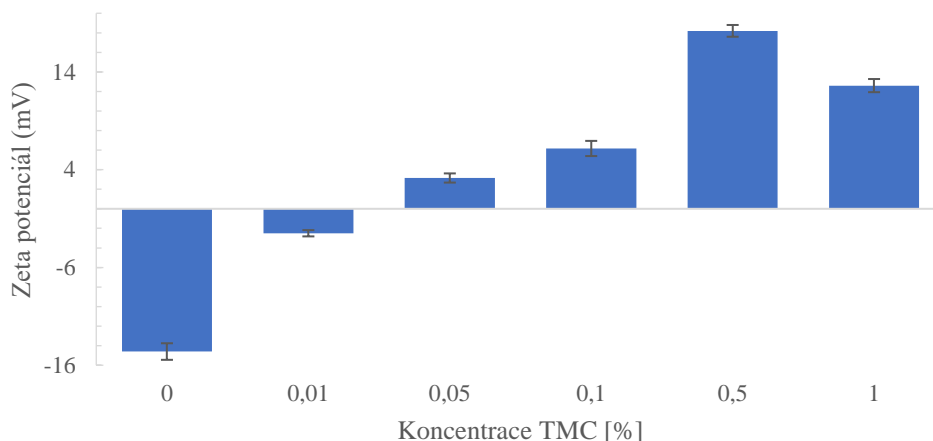
5.4.2 Rehydratace fosfolipidového filmu roztokem TMC

Další metodou přípravy kýženého komplexu je rehydratace fosfolipidového filmu roztokem TMC o určité koncentraci. Velikost takto připravených částic byla následně upravována pomocí sonifikace. Na *Obr. 48* můžeme vidět střední velikosti komplexů v závislosti na různé koncentraci TMC. Můžeme si všimnout, že z počátku je velikost komplexu liposom–TMC podobná střední velikosti stealth liposomů. To může značit, že nějaká část TMC může být enkapsulovaná nebo více vmezeřená do fosfolipidové dvojvrstvy [5]. Vmezeření do fosfolipidové dvojvrstvy je možné právě díky sonifikaci, která probíhala nad teplotou mezifázového přechodu. Vnoření TMC do liposomů je řešeno u předchozí metody přípravy tak, že kombinace TMC a stealth liposomů probíhá při teplotě 10 °C, kdy se předpokládá, že fosfolipidová dvojvrstva je ve fázi gelu.



Obr. 48: Změna střední velikosti částic v závislosti na koncentraci TMC

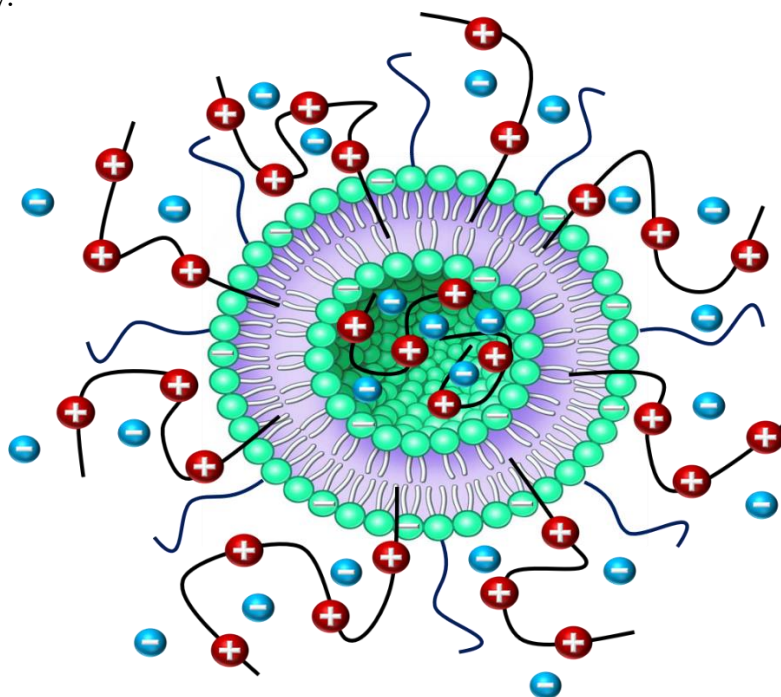
Největší nárůst střední velikosti částic pozorujeme u koncentrace 0,5 mol. %, kdy při tomto druhu přípravy dochází pravděpodobně k navázání největšího množství TMC na povrch liposomů. Při zvýšení koncentrace TMC na 1 % již dochází pouze k mírnému nárůstu velikosti částic a pravděpodobně to svědčí o tom, že do střední velikosti částic již byl započítán i volný TMC. Navíc u této koncentrace TMC byl vzorek velmi polydisperzní s horší reprodukovatelností (viz Přílohy).



Obr. 49: Změna velikosti zeta potenciálu v závislosti na koncentraci TMC

Tomuto popisu odpovídá i změna velikosti zeta potenciálů na *Obr. 49*. Vidíme, že při 0,5 % TMC dosahuje zeta potenciál nejvyšší velikosti (18,2 mV) a poté u 1 % TMC dochází k jeho snížení vlivem odstínění kladného náboje makrokationtů přítomnými protiionty. To, že jsme nedosáhli tak vysokého zeta potenciálu jako při první metodě přípravy si může vysvětlit právě již zmíněným vnořením TMC do fosfolipidové dvojvrstvy nebo jeho enkapsulací. I v tomto případě přípravy se ukazuje 0,01 % TMC jako nedostatečný pro pokrytí celého povrchu stealth liposomu (zeta potenciál je v záporných hodnotách).

Na *Obr. 50* můžeme vidět, jak by mohl vypadat výše popisovaný systém. Můžeme vidět vmezeření polykationtu do fosfolipidové vrstvy a také jeho enkapsulaci. Obě tyto možnosti poskytují vysvětlení, proč nedochází k tak výrazným změnám průměru částic jako u první metody přípravy.



Obr. 50: Vizualizace systému, který vznikl díky rehydrataci fosfolipidového filmu a sonifikací

Při této přípravě liposomů můžeme porovnat výsledky s výzkumnou skupinou pod vedením Bouropoulos B. Při jejich přípravě liposomů s měnící se koncentrací TMC docházelo ke snížení velikosti komplexu liposom–TMC oproti původní velikosti samotného liposomu složeného z fosfatidylcholinu. Shodujeme se pouze v tom, že při srovnání 0,5 % TMC s 1 % TMC došlo pouze k mírnému nárůstu střední velikosti částic. Nejvyšší zeta potenciál byl v jejich případě naměřen u 1 % TMC (8,46 mV) [5].

Tento způsob přípravy komplexu liposom–TMC není zcela úplně vhodný. Nejsme schopni kontrolovat velikost stealth liposomů a následné vázání TMC pouze na povrch liposomů. Vmezeření TMC mezi fosfolipidy by navíc mohlo zhoršovat odpoutání TMC od stealth liposomů v plicních sklípcích – přes těsné spoje by měly do krevního řečiště pokračovat pouze stealth liposomy s léčivem. Kvůli všem těmto důvodům bude daleko lepší zvolit první metodu přípravy.

6 ZÁVĚR

Při řešení diplomové práce se podařilo splnit všechny stanovené cíle. Na základě literární rešerše jsme zvolili nejvhodnější složení vezikulárních systémů, které jsou vhodné pro interakci s trimethylchitosanem. Určili jsme, že liposomy se budou skládat zejména z fosfatidylcholinu s teplotou mezifázového přechodu pod teplotou lidského těla. Tento liposom bude modifikován kyselinou fosfatidovou (opět s vhodnou teplotou mezifázového přechodu), která nám zajistí záporný náboj schopný nekovalentní interakce s TMC. Dále jsme se rozhodli, že do liposomu přidáme i PEG navázaný na fosfatidylethanolaminu abychom vytvořili stealth liposomy, které prodlouží dobu cirkulace částic v krvi a zajistili tak možné pasivní zacílení.

Všechny zvolené fosfolipidy musejí být nasycené, protože pokud bychom chtěli sterilizovat tyto liposomy gama zářením, tak pouze liposomy z nasycených fosfolipidů po gama záření nemají toxické účinky. U cholesterolu jsme se rozhodli, že ho budeme přidávat k liposomům pouze tehdy, pokud by bylo třeba zvýšit stabilitu částic. Jako nejvhodnější množství cholesterolu jsme zjistili poměr 1:2 (cholesterol ku fosfolipidům). Jako nejvhodnější metoda přípravy liposomů byla vybrána rehydratace fosfolipidové vrstvy a velikost částic byla upravována pomocí sonifikace.

Nejvhodnější koncentrace PC byla zvolena na $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a jako nejvhodnější prostředí byla zvolena deionizovaná voda. Při těchto podmínkách docházelo ke vzniku reprodukovatelných liposomů s vhodnou střední velikostí (pod 100–150 nm). Zeta potenciál těchto částic byl kladný, těsně pod hranicí stability. Jako finální koncentrace kyseliny fosfatidové bylo zvoleno 30 mol. %, kdy se nám při této koncentraci podařilo připravit záporně nabitě liposomy s vhodným zeta potenciálem ($-45,60 \pm 7,50$) mV. Kvůli špatné reprodukovatelnosti jsme k PC a PA přidali cholesterol, který stabilizoval liposomy, zlepšil reprodukovatelnost měření a způsobil i užší distribuci liposomů.

Následně jsme přidali k liposomům PEG₅₀₀₀–PE (6 mol. %), který zajistil snížení zeta potenciálu na ($-14,60 \pm 0,85$) mV, což značilo zisk stealth liposomů, které při in vitro i in vivo testech měli prodlouženou dobu cirkulace na úroveň stealth liposomů bez přídavku záporné komponenty. Tyto stealth liposomy měli střední velikost částic ($94,18 \pm 8,89$) nm, splňovali tedy podmínku vhodné velikosti pod 100–150 nm.

Po získání vhodných stealth liposomů s vhodnými vlastnostmi následovala příprava samotného komplexu liposom–TMC. Pro prokázání navázání TMC na stealth liposomy pomocí elektrostatických interakcí jsme využili DLS. Vznik chtěného komplexu jsme následně určovali pomocí změny distribuce částic, změny střední velikosti částic a změny zeta potenciálu částic. Byly zvoleny dvě metody pro přípravu chtěného komplexu, a to kombinace dvou roztoků (TMC a stealth liposomů) nebo přímo rehydratace fosfolipidového filmu roztokem TMC.

U přímé rehydratace fosfolipidového filmu roztokem TMC (0,01; 0,05; 0,1; 0,5 a 1 %), byla pro úpravu velikosti použita sonifikace. U této metody přípravy vznikaly komplexy s obdobnými, popřípadě lehce zvýšenými středními průměry oproti původním stealth liposomům. Docházelo s největší pravděpodobností k částečné enkapsulaci a k vmezeření TMC do fosfolipidové dvojvrstvy vlivem sonifikace nad teplotou mezifázového přechodu. Tato metoda přípravy se neukázala jako nejvhodnější, kvůli tomu, že nám systém nevznikal

pouze díky elektrostatickým interakcím. Proto samotné odpoutání TMC od stealth liposomů v alveolech by mohlo být v tomto případě problémové. Mezi další nevýhody této metody přípravy patří to, že jsme nemohli kontrolovat vlastnosti vznikajících stealth liposomů a to, že zeta potenciál celého komplexu se nacházel pod 30 mV, jednalo se tedy o nestabilní částice, které lehce podléhají agregaci.

Druhá metoda přípravy se ukázala jako daleko vhodnější, komplex byl připravován při 10 °C, kdy se předpokládalo, že fosfolipidy jsou pod teplotou mezifázového přechodu a nedochází tedy vmezeření TMC mezi fosfolipidy. Bylo zvoleno pět koncentrací TMC (0,01; 0,05; 0,1; 0,5 a 1 %) a tři poměry, u kterých se k stealth liposomům přikapával TMC v různém množství (1:1, 1:2 a 1:4). U všech koncentrací docházelo k posunu distribucí vzniklého komplexu oproti samotným stealth liposomům. To značilo vznik chtěného systému. Posun distribucí mezi jednotlivými poměry (1:1, 1:2, 1:4) nebyl tak výrazný jako posun distribucí mezi stealth liposomy a komplexy stealth liposom–TMC.

Při měření střední velikosti stealth liposomů docházelo k jejich zvětšení po přidavku TMC. Měřené částice po přidavku TMC byly u čtyř posledních koncentrací TMC (0,05; 0,1; 0,5 a 1 %) stejně velké, a to u všech poměrů. To, že nedochází k výrazným změnám středních velikostí částic při přidavku různých koncentrací TMC si můžeme vysvětlit tak, že nad koncentrací 0,01 % TMC dochází k vysycení záporných nábojů v stealth liposomech a další TMC není schopný se navázat na liposomy vlivem elektrostatické repulze mezi navázanými a nenavázanými polykatitonty. Při zaměření se na jednotlivé poměry zjistíme, že u poměru 1:1 máme poměrně velké odchylky měření. Pravděpodobně za to mohou velké repulze mezi makrokationty u navázaného TMC, které výrazněji zvětšují měřené částice, a zhoršují reprodukovatelnost měření. U poměru 1:2 dochází ke stabilizaci komplexu, odchylky měření jsou poměrně malé, měření je dobře reprodukovatelné. U posledního poměru 1:4 opět dojde k nárůstu chyby měření. Tento nárůst můžeme pravděpodobně přisuzovat nenavázanému TMC. Ten se mohl u měření výrazněji projevit a negativně ovlivnit měření.

Při navázání TMC na stealth liposomy docházelo ke zvýšení původního zeta potenciálu. U nejnižší koncentrace TMC jsme se u nejvyššího poměru nacházely v lehce kladných hodnotách. U koncentrací 0,05 a 0,1 % TMC jsme se již dostali k hodnotám nad 30 mV a podařilo se nám tedy připravit stabilní částice. U dvou nejvyšších koncentrací TMC došlo ke snížení zeta potenciálu vlivem odstiňujícího efektu protiiontů, který se projevil až u vyšších koncentrací TMC.

Díky změně zeta potenciálu u koncentrace 0,1 % TMC u různých poměrů jsme mohli porovnáním našich výsledků s výsledky výzkumných skupin prokázat to, že vrstva PEG nijak nebrání nekovalentní vazbě kyseliny fosfatidové a TMC. Dle mého názoru je tahle vazba možná kvůli poměrně dalekému dosahu elektrostatických interakcí.

Na základě experimentů se jako nejvhodnější metoda přípravy jeví postupné přidávání roztoku TMC do míchajícího roztoku stealth liposomů při teplotě 10 °C. Jako nejvhodnější koncentraci jsme zvolili 0,1 % TMC v poměru 1:2, kdy nám vznikají dobře reprodukovatelné a stabilní částice.

Na základě rešerše a experimentů se nám podařilo připravit systému, který má potenciální využití v oblasti inhalačního podávání. Neměl by být toxický, všechny jeho části by měly být

bez potíží odbouratelné a díky použití TMC by se měl stealth liposom bezproblémově dostat do krevního řečiště přes plicní sklípky. V krevním řečišti by poté měl mít dostatečný čas pro zacílení do nádorů díky vhodné velikosti a díky obsahu PEG, který zabrání okamžitému vychytávání částic z krevního řečiště imunitním systémem.

Myslím si, že změna distribuce, změna střední velikosti a změna zeta potenciálu jsou dostatečné pro potvrzení vzniku systému. Bylo by však vhodné zkusit využít i jinou metodu pro ověření vzniku komplexu než pouze dynamický rozptyl světla. Další metoda, která by mohla být vhodná pro ověření vzniku systému je bezpochyby fluorescenční korelační spektroskopie, díky které bychom mohly potvrdit vazbu TMC na stealth liposom změnou difúzního koeficientu. Další možností je i kroskorelační spektroskopie, pokud by se nám podařilo kovalentně navázat na trimethylchitosan fluorescenční sondu.

Ač se nám podařilo připravit chtěný systém, který by mohl najít využití, tak se nám otevřelo spoustu dalších problémů k vyřešení. Prvním problémem je, jakým způsobem se bude daný systém inhalovat. Máme dvě možnosti – nebulizátory a inhalace suchých prášků (DPIs – dry powder inhalers). Lepší a více propagovaná metoda je inhalace suchých prášků. Proto by bylo potřeba zjistit, zda je náš systém schopný po vysušení (lyofilizaci) a zpětném přidání vody opětovné formulace systému se stejnými vlastnostmi (velikost a zeta potenciál). Pokud ano, více by nebylo třeba řešit a mohlo by dojít ke konkrétnějším testům například na umělých plicích nebo na plicních buňkách.

Pokud bychom po vysušení nezískali zpět chtěný systém, museli bychom využít pro inhalaci systému nebulizátory. V tomto případě bychom museli změnit prostředí, ve kterém dochází k formulaci celého komplexu. Roztoky, které se používají pro inhalační podávání pomocí nebulizátorů, mají osmomolaritu upravenou (např. NaCl) na 300 osmol/l. Proto bychom museli zjistit, jak se daný komplex bude chovat v roztoku o vyšší iontové síle a zda nám toto prostředí nebude bránit vzniku celého komplexu a liposomům o chtěných velikostech.

Fosfolipid, který jsme použili pro přípravu liposomů není tolik známý. Zvolili jsme ho z důvodu vhodné teploty mezifázového přechodu i bez přídavku cholesterolu. Vzhledem k tomu, že nakonec do systému přidáváme cholesterol mohli bychom zkusit i jiný, známější fosfolipid jako hlavní složku liposomu – například DPPC (dipalmitoylfosfatidylcholin), který je daleko prozkoumanější.

V předchozích čtyřech odstavcích jsme se snažili navrhnout další experimenty, které by mohly navázat na tuto diplomovou práci a doplnit tuto problematiku o velmi cenné informace. Jmenovitě to tedy jsou: ověření navázání TMC na stealth liposom pomocí fluorescence, zkusit lyofilizovat systém, zvýšit iontovou sílu prostředí ve kterém dochází k formulaci liposomů a zaměnit 15:0 PC za DPPC.

7 ZDROJE

- [1] HUANG, Aiwen, Abdallah MAKHLOF, Qineng PING, Yuichi TOZUKA a Hirofumi TAKEUCHI. N-trimethyl chitosan-modified liposomes as carriers for oral delivery of salmon calcitonin. *Drug Delivery* [online]. Taylor, 2011, roč. 18, č. 8, s. 562-569 [cit. 2018-08-14]. DOI: 10.3109/10717544.2011.596585. ISSN 1071-7544.
- [2] CAO, Jinna, Jukui SUN, Xiaoyu WANG, Xinran LI a Yingjie DENG. N -Trimethyl chitosan-coated multivesicular liposomes for oxymatrine oral delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy* [online]. Taylor, 2009, roč. 35, č. 11, s. 1339-1347 [cit. 2018-08-14]. DOI: 10.3109/03639040902902427. ISSN 0363-9045.
- [3] ZHANG, Jing a Siling WANG. Topical use of coenzyme Q10-loaded liposomes coated with trimethyl chitosan: tolerance, precorneal retention and anti-cataract effect. *International journal of pharmaceutics* [online]. 2009, roč. 372, č. 1-2, s. 66 [cit. 2018-08-14]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2009.01.001.
- [4] BAHMAN KHAMENEH, , MAHDI MOMEN-NEJAD a MOHSEN TAFAGHODI. In vivo evaluation of mucoadhesive properties of nanoliposomal formulations upon coating with trimethylchitosan polymer. *Nanomedicine Journal* [online]. Mashhad University of Medical Sciences, 2014, roč. 1, č. 3, s. 147-154 [cit. 2018-08-14]. DOI: 10.7508/nmj.2014.03.004. ISSN 2322-3049.
- [5] VAN DER MERWE, Susanna, Nicolaos BOUROPOULOS, Dimitrios LAMPROU, Orestis KATSAMENIS a Dimitris FATOUROS. Preparation and Characterization of Large Unilamellar Vesicles Mixed with Trimethylchitosan (TMC): The Effect of Polyelectrolyte Concentration [online]. Bentham Science, 2017, s. 1-4 [cit. 2018-08-14]. ISSN 2213-5294.
- [6] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 2. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 80-708-0422-X.
- [7] LEE, Janet a Andrew SPICER. Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Current Opinion in Cell Biology* [online]. 2000, roč. 12, č. 5, s. 581-586 [cit. 2018-09-06]. DOI: 10.1016/S0955-0674(00)00135-6. ISSN 09550674.
- [8] RIGHETTI, Pier. *Isoelectric Focusing: Theory, Methodology and Application, Volume 11* [online]. 1. New York: Elsevier Science, 1983 [cit. 2018-09-06]. ISBN 9780080858807.
- [9] KODÍČEK, Milan a Vladimír KARPENKO. *Biofyzikální chemie*. 2. přepr. a rozš. vyd. Praha: Academia, 2000, 337 s. ISBN 80-200-0791-1.
- [10] THANOU, Maya, J.Coos VERHOEF, Stefan ROMEIJN, J.Fred NAGELKERKE, Frans MERKUS a Hans JUNGINGER. Effects of N-trimethyl chitosan chloride, a novel absorption enhancer, on Caco-2 intestinal epithelia and the ciliary beat frequency of chicken embryo trachea. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. Elsevier B.V, 1999, roč. 185, č. 1, s. 73-82 [cit. 2018-09-06]. DOI: 10.1016/S0378-5173(99)00126-X. ISSN 0378-5173.

- [11] KOTZÉ, Awie, Henrik LUEßEN, Bas DE LEEUW, (A)Bert DE BOER, J. VERHOEF a Hans JUNGINGER. N-Trimethyl Chitosan Chloride as a Potential Absorption Enhancer Across Mucosal Surfaces: In Vitro Evaluation in Intestinal Epithelial Cells (Caco-2). *Pharmaceutical Research* [online]. New York: Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers, 1997, roč. 14, č. 9, s. 1197-1202 [cit. 2018-09-06]. DOI: 10.1023/A:1012106907708. ISSN 0724-8741.
- [12] KULKARNI, Abhijeet, Harun PATEL, Sanjay SURANA, Yogesh VANJARI, Veena BELGAMWAR a Chandrakantsing PARDESHI. N,N,N-Trimethyl chitosan: An advanced polymer with myriad of opportunities in nanomedicine. *Carbohydrate Polymers* [online]. Elsevier Ltd, 2017, roč. 157, s. 875-902 [cit. 2018-09-27]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.10.041. ISSN 0144-8617
- [13] MOURYA, V. a Nazma INAMDAR. Trimethyl chitosan and its applications in drug delivery. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. Boston: Springer US, 2009, roč. 20, č. 5, s. 1057-1079 [cit. 2018-09-27]. DOI: 10.1007/s10856-008-3659-z. ISSN 0957-4530.
- [14] HSU, Li-Wen, Pei-Ling LEE, Chiung-Tong CHEN, Fwu-Long MI, Jyuhn-Huarng JUANG, Shiau-Min HWANG, Yi-Cheng HO a Hsing-Wen SUNG. Elucidating the signaling mechanism of an epithelial tight-junction opening induced by chitosan. *Biomaterials* [online]. 2012, roč. 33, č. 26, s. 6254 [cit. 2018-09-27]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.05.013.
- [15] FLOREA, Bogdan, Maya THANOU, Hans JUNGINGER a Gerrit BORCHARD. Enhancement of bronchial octreotide absorption by chitosan and N-trimethyl chitosan shows linear in vitro/in vivo correlation. *Journal of Controlled Release* [online]. Elsevier B.V, 2006, roč. 110, č. 2, s. 353-361 [cit. 2018-10-01]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2005.10.001. ISSN 0168-3659.
- [16] Plíce SFLT. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2018-09-30]. Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/Pl%C3%ADce_\(SFLT\)](https://www.wikiskripta.eu/w/Pl%C3%ADce_(SFLT))
- [17] MUZZARELLI, Riccardo, Joseph BOUDRANT, Diederick MEYER, Nicola MANNO, Marta DEMARCHIS a Maurizio PAOLETTI. Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. *Carbohydrate Polymers* [online]. Elsevier Ltd, 2012, roč. 87, č. 2, s. 995-1012 [cit. 2018-10-06]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.09.063. ISSN 0144-8617.
- [18] ZHU, Zhou, Tao ZHENG, Robert HOMER, Yoon-Keun KIM, Ning CHEN, Lauren COHN, Qutayba HAMID a Jack ELIAS. Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 2004, roč. 304, č. 5677, s. 1678 [cit. 2018-10-06]. DOI: 10.1126/science.1095336.

- [19] TIFFANY A. REESE, , HONG-ERH LIANG, ANDREW M. TAGER, ANDREW D. LUSTER, NICO VAN ROOIJEN, DAVID VOEHRINGER a RICHARD M. LOCKSLEY. Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. *Nature* [online]. Nature Publishing Group, 2007, roč. 447, č. 7140, s. 92 [cit. 2018-10-06]. DOI: 10.1038/nature05746. ISSN 0028-0836.
- [20] PAOLETTI, Maurizio, Lorenzo NORBERTO, Roberta DAMINI a Salvatore MUSUMECI. Human Gastric Juice Contains Chitinase That Can Degrade Chitin. *Annals of Nutrition and Metabolism* [online]. Basel, Switzerland, 2007, roč. 51, č. 3, s. 244-251 [cit. 2018-10-06]. DOI: 10.1159/000104144. ISSN 0250-6807.
- [21] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. oprav. vyd. Praha: Academia, 1996, 191 s. ISBN 80-200-0600-1.
- [22] SOFROVÁ, Danuše. *Biochemie: základní kurz*. 3. vyd. Praha: Karolinum, 2005, 241 s. ISBN 80-7184-936-7.
- [23] ATKINS, P. a Julio DE PAULA. *Fyzikální chemie*. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2013. ISBN ISBN978-80-7080-830-6.
- [24] KRAFT, John, Jennifer FREELING, Ziyao. WANG a Rodney HO. Emerging Research and Clinical Development Trends of Liposome and Lipid Nanoparticle Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. Elsevier Inc, 2014, roč. 103, č. 1, s. 29-52 [cit. 2018-10-15]. DOI: 10.1002/jps.23773. ISSN 0022-3549.
- [25] SOLARO, Roberto, Federica CHIELLINI a Antonella BATTISTI. Targeted Delivery of Protein Drugs by Nanocarriers. *Materials* [online]. Basel: MDPI AG, 2010, roč. 3, č. 3, s. 1928-1980 [cit. 2018-10-15]. DOI: 10.3390/ma3031928.
- [26] PANDEY, Himanshu, Radha RANI a Vishnu AGARWAL. Liposome and Their Applications in Cancer Therapy. *Brazilian Archives of Biology and Technology* [online]. Instituto de Tecnologia do Paraná - Tecpar, 2016, roč. 59 [cit. 2019-04-06]. DOI: 10.1590/1678-4324-2016150477. ISSN 1678-4324.
- [27] Why are liposomes so good for the skin?. *SPA CANADA* [online]. Toronto: SPA CANADA magazines, 2017 [cit. 2018-10-24]. Dostupné z: <http://spacanada.ca/liposomes-good-skin/>
- [28] Clearance. *Velký lékařský slovník* [online]. Praha: Maxdorf s.r.o., 1998 [cit. 2018-10-24]. Dostupné z: <http://lekarske.slovníky.cz/lexikon-pojem/clearance-vysl-klirens-2>
- [29] LEE, Robert a Philip LOW. Folate-mediated tumor cell targeting of liposome-entrapped doxorubicin in vitro. *BBA - Biomembranes* [online]. Elsevier B.V, 1995, roč. 1233, č. 2, s. 134-144 [cit. 2018-10-16]. DOI: 10.1016/0005-2736(94)00235-H. ISSN 0005-2736.

- [30] LIU, Dexi, Feng LIU a Young SONG. Recognition and clearance of liposomes containing phosphatidylserine are mediated by serum opsonin. *BBA - Biomembranes* [online]. Elsevier B.V, 1995, roč. 1235, č. 1, s. 140-146 [cit. 2018-10-26]. DOI: 10.1016/0005-2736(95)00005-N. ISSN 0005-2736.
- [31] DRUMMOND, D, O MEYER, K HONG, D KIRPOTIN a D PAPAHAADJOPOULOS. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacological reviews* [online]. 1999, roč. 51, č. 4, s. 691 [cit. 2018-10-16]. ISSN 0031-6997.
- [32] CHOI, Chung, Jonathan ZUCKERMAN, Paul WEBSTER a Mark DAVIS. Targeting kidney mesangium by nanoparticles of defined size. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2011, roč. 108, č. 16, s. 6656 [cit. 2018-10-17]. DOI: 10.1073/pnas.1103573108.
- [33] SARIN, Hemant. Physiologic upper limits of pore size of different blood capillary types and another perspective on the dual pore theory of microvascular permeability. *Journal of angiogenesis research* [online]. 2010, roč. 2, č. 1, s. 14 [cit. 2018-10-17]. DOI: 10.1186/2040-2384-2-14.
- [34] VERONESE, Francesco a Gianfranco PASUT. PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discovery Today* [online]. Elsevier Ltd, 2005, roč. 10, č. 21, s. 1451-1458 [cit. 2018-10-18]. DOI: 10.1016/S1359-6446(05)03575-0. ISSN 1359-6446.
- [35] OWENS, Donald a Nicholas PEPPAS. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. Elsevier B.V, 2006, roč. 307, č. 1, s. 93-102 [cit. 2018-10-18]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2005.10.010. ISSN 0378-5173.
- [36] ZEISIG, Reiner, Kazuhiko SHIMADA, Sadao HIROTA a Dieter ARNDT. Effect of sterical stabilization on macrophage uptake in vitro and on thickness of the fixed aqueous layer of liposomes made from alkylphosphocholines. *BBA - Biomembranes* [online]. Elsevier B.V, 1996, roč. 1285, č. 2, s. 237-245 [cit. 2018-10-26]. DOI: 10.1016/S0005-2736(96)00167-8. ISSN 0005-2736.
- [37] LEVCHENKO, Tatiana, Ram RAMMOHAN, Anatoly LUKYANOV, Kathleen WHITEMAN a Vladimir TORCHILIN. Liposome clearance in mice: the effect of a separate and combined presence of surface charge and polymer coating. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. Elsevier B.V, 2002, roč. 240, č. 1, s. 95-102 [cit. 2018-08-27]. DOI: 10.1016/S0378-5173(02)00129-1. ISSN 0378-5173.
- [38] CHIU, Gigi, Marcel BALLY a Lawrence MAYER. Selective protein interactions with phosphatidylserine containing liposomes alter the steric stabilization properties of poly(ethylene glycol). *BBA - Biomembranes* [online]. Elsevier B.V, 2001, roč. 1510, č. 1-2, s. 56-69 [cit. 2018-10-18]. DOI: 10.1016/S0005-2736(00)00335-7. ISSN 0005-2736.

- [39] SVOBODA, Jan, Kamila SYSLOVÁ a Petr KAČER. Cílený transport platinových cytostatik. *Chemické listy*. 2016, roč. 110, č. 12, 909-916.
- [40] MAEDA, H, J WU, T SAWA, Y MATSUMURA a K HORI. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of Controlled Release* [online]. Elsevier B.V, 2000, roč. 65, č. 1, s. 271-284 [cit. 2018-10-18]. DOI: 10.1016/S0168-3659(99)00248-5. ISSN 0168-3659.
- [41] LAWRENCE RAJENDRAN, , HANS-JOACHIM KNÖLKER a KAI SIMONS. Subcellular targeting strategies for drug design and delivery. *Nature Reviews Drug Discovery* [online]. Nature Publishing Group, 2010, roč. 9, č. 1, s. 29 [cit. 2018-10-22]. DOI: 10.1038/nrd2897. ISSN 1474-1776.
- [42] PILCER, Gabrielle a Karim AMIGHI. Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. Elsevier B.V, 2010, roč. 392, č. 1, s. 1-19 [cit. 2018-10-24]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.03.017. ISSN 0378-5173.
- [43] First-pass efekt. *Velký lékařský slovník* [online]. Praha: Maxdorf, s.r.o., 1998 [cit. 2018-10-24]. Dostupné z: <http://lekarske.slovníky.cz/pojem/first-pass-efekt>
- [44] Orofarynx. *Velký lékařský slovník* [online]. Praha: Maxdorf s.r.o, 1998 [cit. 2018-10-24]. Dostupné z: <http://lekarske.slovníky.cz/pojem/orofarynx>
- [45] BHATTACHARJEE, Sourav. DLS and zeta potential – What they are and what they are not?. *Journal of Controlled Release* [online]. Elsevier B.V, 2016, roč. 235, s. 337-351 [cit. 2018-10-30]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017. ISSN 0168-3659.
- [46] Dynamic Light Scattering. *LS Instruments AG* [online]. Fribourg: LS Instruments AG, b.r. [cit. 2019-04-06]. Dostupné z: <https://lsinstruments.ch/en/technology/dynamic-light-scattering-dls>
- [47] HAWE, Andrea, Wendy HULSE, Wim JISKOOT a Robert FORBES. Taylor Dispersion Analysis Compared to Dynamic Light Scattering for the Size Analysis of Therapeutic Peptides and Proteins and Their Aggregates. *Pharmaceutical Research* [online]. Boston: Springer US, 2011, roč. 28, č. 9, s. 2302-2310 [cit. 2018-10-30]. DOI: 10.1007/s11095-011-0460-3. ISSN 0724-8741.
- [48] Dynamic Light Scattering: Theory. *LS Instruments AG* [online]. LS Instruments AG, b.r. [cit. 2019-04-06]. Dostupné z: <https://lsinstruments.ch/en/technology/dynamic-light-scattering-dls/dynamic-light-scattering-theory/>
- [49] Zetasizer Nano ZS90. *Malvern Panalytical* [online]. Velká Británie: Malvern Panalytical Ltd, 2015 [cit. 2018-10-30]. Dostupné z: <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs90>

- [50] MONTES RUIZ-CABELLO, F, Gregor TREFALT, Plinio MARONI a Michal BORKOVEC. Electric double-layer potentials and surface regulation properties measured by colloidal-probe atomic force microscopy. *Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics* [online]. 2014, roč. 90, č. 1, s. 12301 [cit. 2018-10-31]. DOI: 10.1103/PhysRevE.90.012301.
- [51] STENSRUD, G. a MÖNKKÖNEN. Toxicity of gamma irradiated liposomes: 2. In vitro effects on cells in culture. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. Elsevier B.V, 1999, roč. 178, č. 1, s. 47-53 [cit. 2019-01-30]. DOI: 10.1016/S0378-5173(98)00357-3. ISSN 0378-5173.
- [52] MILLER, Christina, Bruce BONDURANT, Shannon MCLEAN, Kathy MCGOVERN a David O'BRIEN. Liposome–Cell Interactions in Vitro: Effect of Liposome Surface Charge on the Binding and Endocytosis of Conventional and Sterically Stabilized Liposomes †. *Biochemistry* [online]. 1998, roč. 37, č. 37, s. 12875-12883 [cit. 2019-01-29]. DOI: 10.1021/bi980096y. ISSN 0006-2960.
- [53] SMISTAD, Gro a JACOBSEN. Multivariate toxicity screening of liposomal formulations on a human buccal cell line. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. Elsevier B.V, 2007, roč. 330, č. 1, s. 14-22 [cit. 2019-01-29]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2006.08.044. ISSN 0378-5173.
- [54] BRIUGLIA, Maria-lucia;rotella. Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. *Drug Delivery and Translational Research* [online]. New York: Springer US, 2015, roč. 5, č. 3, s. 231-242 [cit. 2019-02-10]. DOI: 10.1007/s13346-015-0220-8. ISSN 2190-393X.
- [55] MANCA, Maria letizia, Maria MANCONI, Donatella VALENTI, Francesco LAI, Giuseppe LOY, Pietro MATRICARDI a Anna maria FADDA. Liposomes coated with chitosan–xanthan gum (chitosomes) as potential carriers for pulmonary delivery of rifampicin. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. Hoboken: Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 2012, roč. 101, č. 2, s. 566-575 [cit. 2019-03-29]. DOI: 10.1002/jps.22775. ISSN 0022-3549.
- [56] PEIRA, E., M. TROTTA, M.E. CARLOTTI, M. GALLARATE a D. CHIRIO. Elastic positively-charged liposomes for topical administration of acyclovir. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* [online]. 2007, roč. 17, č. 5, 321-324 [cit. 2019-02-23]. DOI: 10.1016/S1773-2247(07)50049-3. ISSN 17732247.
- [57] HARA, Masayuki, Masao MIYAKE, Sadayo IJIMA, Qing YANG, Takaaki ARAI, Huiqing YUAN a Jun MIYAKE. Interaction between a novel amphiphilic polymer and liposomes. *Supramolecular Science* [online]. 1998, roč. 5, č. 5-6, s. 777-781 [cit. 2019-03-01]. DOI: 10.1016/S0968-5677(98)00124-2. ISSN 09685677.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

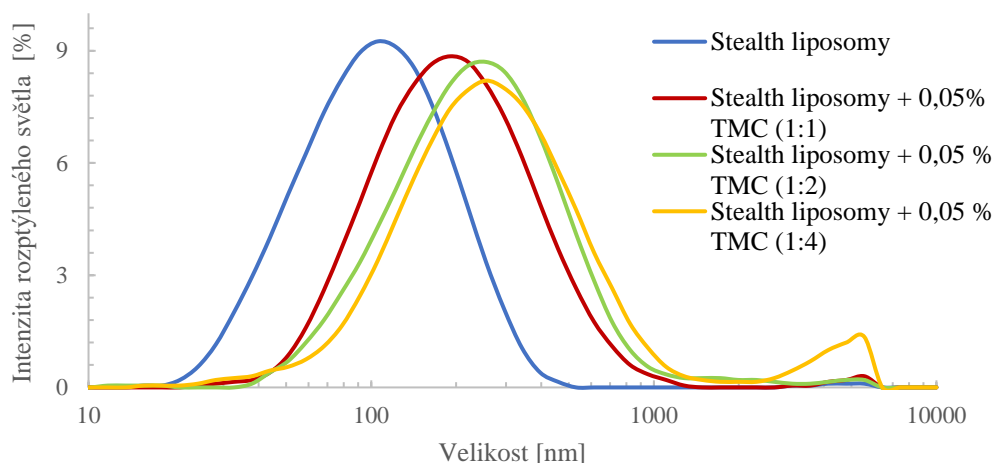
8.1 Seznam zkratek

12:0 PA	1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-fosfát (sodná sůl)
15:0 PC	1,2-dipentadekanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfocholin
CAC	kritická agregační koncentrace
DLS	dynamický rozptyl světla
DPIs	Dry powder inhalers
DPPC	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-fosfocholin
EPR	zvýšená propustnost a retence
LUV	velké unilamelární vezikuly
MLV	velké multilamelární vezikuly
PA	kyselina fosfatidová
PBS pufr	fosfátový pufr
PC	fosfatidylcholin
PDI	polydisperzní index
PE	fosfatidylethanolamin
PEG	polyethylenglykol
PEG ₅₀₀₀ -PE	polyethylenglykol o Mr 5000 navázaný na PE
QELS	Kvazielastický rozptyl světla
SUV	malé unilamelární vezikuly
TJ	tight junction
T _m	teplota mezifázového přechodu
TMC	trimethylchitosan

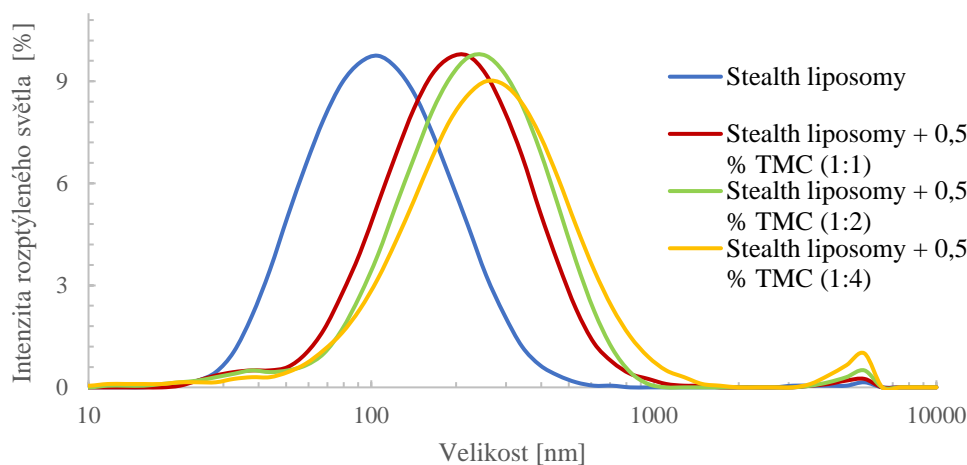
8.2 Seznam symbolů

D	difúzní koeficient
F	síla
G	Gibbsova energie
H	enthalpie
k _B	boltzmanova konstanta
Mr	relativní molekulová hmotnost
q	náboj
S	entropie
T	termodynamická teplota
ε	relativní permitivita prostředí
ε ₀	permitivita vakua
η ₀	viskozita rozpouštědla
λ	vlnová délka

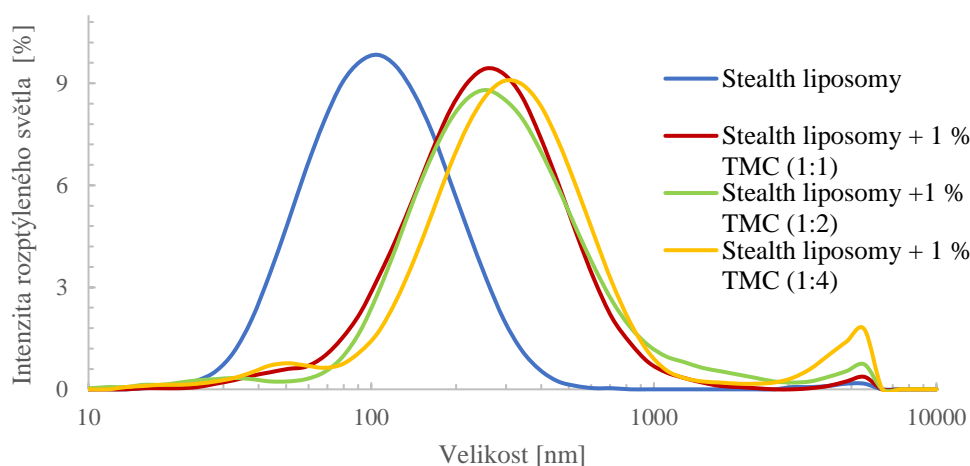
9 PŘÍLOHY



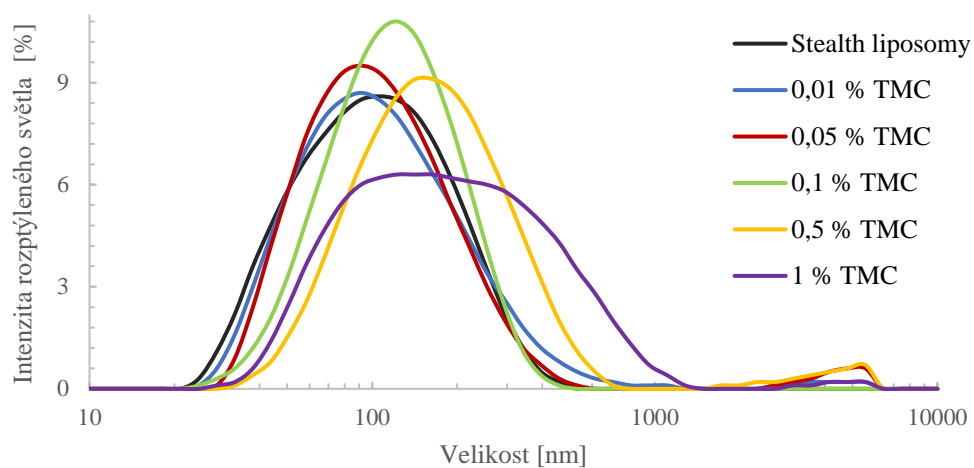
Obr. 51: Posun distribuce stealth liposomů po přidavku 0,05 % TMC



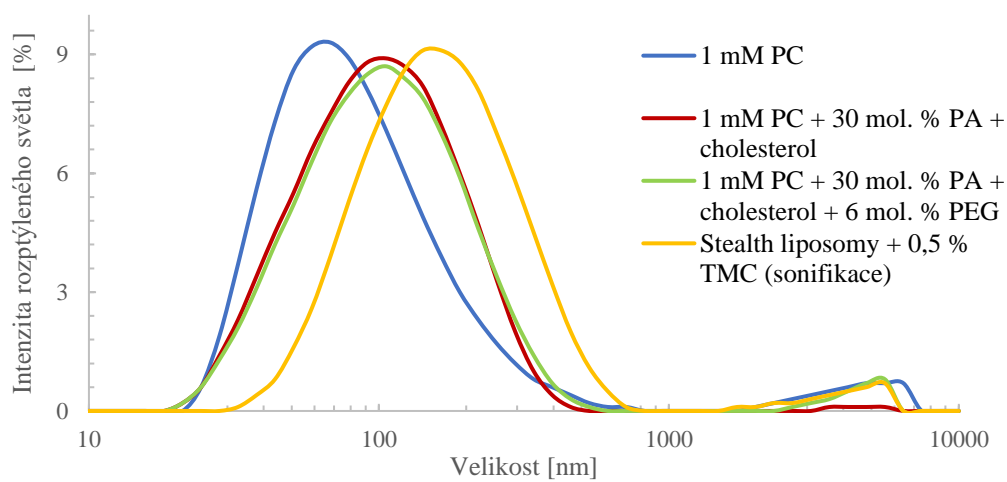
Obr. 52: Posun distribuce stealth liposomů po přidavku 0,5 % TMC



Obr. 53: Posun distribuce stealth liposomů po přidavku 1 % TMC



Obr. 54: Distribuce částic po rehydrataci fosfolipidového filmu pomocí určité koncentrace TMC



Obr. 55: Postupná změna distribuce částic po přidání jednotlivých komponent, kdy komplex byl připravován sonifikací